

**Aktivität der sezernierten Sphingomyelinase bei akuter und  
chronischer systemischer Inflammation am Beispiel des SIRS,  
der Sepsis und der chronischen Herzinsuffizienz**

Dissertation

Zur Erlangung des akademischen Grades  
doctor medicinae (Dr. med.)

**vorgelegt dem Rat der Medizinischen Fakultät  
der Friedrich-Schiller Universität Jena**

**von Alexander Christian Bunck  
geboren am 22. Januar 1979 in Bonn**

Gutachter:

1. Prof. Dr. med. M. Bauer
2. PD Dr. med. U. F. W. Franke
3. Prof. Dr. med. E. Gulbins

Tag der öffentlichen Verteidigung: 03.07.2007

# Inhaltsverzeichnis

<b>Abkürzungsverzeichnis</b>	<b>V</b>
<b>Zusammenfassung</b>	<b>VI</b>
<b>1. Einleitung</b>	<b>1</b>
<b>1.1. Inflammation</b>	1
<b>1.2. Generalisierung der Inflamationsreaktion</b>	2
<b>1.3. SIRS, Sepsis, schwere Sepsis und septischer Schock</b>	4
<i>1.3.1. Definition</i>	4
<i>1.3.2. Epidemiologie</i>	5
<i>1.3.3. Monitoring der Inflamationsreaktion</i>	5
<b>1.4. Wechselwirkungen zwischen systemischer Inflammation und kardiovaskulärem System</b>	6
<b>1.5. Inflammation und Herzinsuffizienz – Herzinsuffizienz und Inflammation</b>	8
<b>1.6. Antizytokintherapien bei Sepsis und Herzinsuffizienz</b>	9
<b>1.7. Sphingolipide</b>	10
<b>1.8. Sphingomyelinasen und der Sphingomyelinstoffwechsel</b>	11
<b>1.9. Die saure Sphingomyelinase und ihre Isoformen</b>	12
<b>1.10. Studienlage zur sSMPD1 Aktivität im Blut</b>	14
<b>1.11. Sphingolipide und Inflammation</b>	15
<b>2. Zielsetzung</b>	<b>17</b>
<b>3. Material und Methoden</b>	<b>18</b>
<b>3.1. Verwendete Materialien</b>	18
<b>3.2. Verwendete Geräte</b>	18
<b>3.3. Laborchemische Verfahren</b>	19
3.3.1. Bestimmung der sphingolytischen Aktivität im Blutplasma/-serum	19
<i>Inkubation</i>	20
<i>Extraktion</i>	20

<i>Dünnschichtchromatographie (DC) und Auswertung</i>	21
3.3.2. Bestimmung der sTNF- $\alpha$ RI Konzentration	22
<b>3.4. Patientenstudien</b>	23
3.4.1. Patienten mit elektivem, herzchirurgischen Eingriff	24
<i>Probenentnahme</i>	24
<i>Multiplexanalyse</i>	25
<i>Statistische Auswertung</i>	25
3.4.2. Patienten mit schwerer Sepsis und septischen Schock	26
<i>Probenentnahme</i>	26
<i>Patientencharakterisierung</i>	27
<i>Ergebnispräsentation und statistische Analyse</i>	27
3.4.3. Patienten mit chronischer Herzinsuffizienz	28
<i>Studienpopulation</i>	28
<i>Konstitutionsbestimmung</i>	29
<i>Spiroergometrie</i>	29
<i>Bestimmung der Muskelkraft</i>	30
<i>Plethysmographie</i>	30
<i>Statistische Methode</i>	30
<b>3.5. Einfluss von oxidativem Stress auf die sSMPD1 Aktivität</b>	31
<i>Statistische Methode</i>	31
<b>3.6. Graphische Darstellung der Ergebnisse</b>	32
 <b>4. Ergebnisse</b>	 <b>33</b>
<b>4.1. Patientenstudien</b>	33
4.1.1. Patienten mit elektivem, herzchirurgischen Eingriff	33
<i>Patientencharakterisierung</i>	33
<i>Ergebnisse der Multiplexanalyse</i>	34
<i>sSMPD1 Aktivität bei Patienten nach</i> <i>herzchirurgischem Eingriff (MIDCAB und HLM)</i>	37
4.1.2. <i>sSMPD1 Aktivität bei Patienten mit Sepsis oder septischem</i> <i>Schock</i>	40
<i>Patientencharakterisierung</i>	40
<i>sSMPD1 Aktivität</i>	41

<i>Vergleich der sSMPD1 Aktivität mit dem     SOFA-Score und Procalcitonin</i>	43
4.1.3. sSMPD1 Aktivität bei Patienten mit chronischer Herzinsuffizienz	44
<i>sSMPD1 Aktivität bei CHF mit und ohne Kachexie     und in Relation zu proinflammatorischen     Zytokinen sowie anderer klinischer Parameter</i>	44
<i>sSMPD1 Aktivität und körperliche Konstitution</i>	49
<i>Skelettmuskelleistung und Blutfluss</i>	50
4.2. Steigerung der enzymatischen sSMPD1 Aktivität durch oxidativen Stress	53
<b>5. Diskussion</b>	<b>55</b>
<b>5.1. sSMPD1 Aktivität in Abhängigkeit von der Schwere der     Inflamationsreaktion</b>	55
5.1.1. <i>Patienten mit elektivem herzchirurgischen Eingriff</i>	55
5.1.2. <i>Patienten mit schwerer Sepsis oder septischem Schock</i>	57
5.1.3. <i>Patienten mit chronischer Herzinsuffizienz</i>	57
<b>5.2. Mechanismen, die zu einer gesteigerten sSMPD1 Aktivität führen</b>	58
5.2.1. <i>Der Einfluss von Zytokinen auf die sSMPD1 Aktivität</i>	58
5.2.2. <i>sSMPD1 Aktivität und oxidativer Stress</i>	60
5.2.3. <i>Ceramid und sSMPD1 Aktivität</i>	61
<b>5.3. Mögliche Wirkungsweisen der sezernierten Sphingomyelinase</b>	62
5.3.1. <i>extrazellulärer Sphingomyelinstoffwechsel</i>	62
5.3.2. <i>Wirkung nach Endozytose</i>	64
5.3.3. <i>sSMPD1 und ceramidreiche Membranplattformen</i>	64
<b>5.4. Hemmung der SMPD1 – ein potentielles therapeutisches Target in     der Behandlung des Organversagens bei SIRS und Sepsis?</b>	66
<b>5.5. sSMPD1 und ihr Einfluss auf Funktionsparameter der     Herzinsuffizienz</b>	69
<b>5.6. sSMPD1 und mögliche Auswirkungen auf die Vasomotorik</b>	70
<b>5.7. Erhöhte sSMPD1 Aktivität bei kardialer Kachexie</b>	72
<b>5.8. sSMPD1 und die fettgewebsfreie Körpermasse</b>	72

<b>5.9. sSMPD1 und Muskelfunktion</b>	<b>73</b>
<b>6. Schlussfolgerungen</b>	<b>75</b>
<b>7. Literaturverzeichnis</b>	<b>77</b>
<b>Anhang</b>	<b>86</b>

## Abkürzungsverzeichnis

AAPH	2, 2-Azobis-(2-Amidinopropan) Dihydrochlorid
APACHE	Acute Physiology and Chronic Health Evaluation
aPTT	<i>activated partial thromboplastin time</i>
Asc	Ascorbinsäure
BMI	<i>body mass index</i>
CHF	chronische Herzinsuffizienz
CRP	C-reaktives Protein
DC	Dünnschichtchromatographie
EC	<i>enzyme code</i>
HLM	Herzlungenmaschine
IFN- $\beta$	Interferon beta
IFN- $\gamma$	Interferon gamma
IL-1 $\beta$	Interleukin 1 beta
IL-6	Interleukin 6
kDa	kilo Dalton
LDL	<i>low density</i> Lipoprotein
MIDCAB	<i>minimally invasive direct coronary artery bypass</i>
MODS	<i>multiple organ failure syndrome</i>
NBD-Sphingomyelin	N-([7-Nitrobenz-2-oxa-1,3-diazol-4-yl]-aminohexanoyl) sphingosylphosphocholin
NO	Stickstoffmonoxid
NP	<i>Nonidet P</i>
PAF	<i>platelet activating factor</i>
SE	Standardfehler
sIL-1Ra	löslicher Interleukin 1 Rezeptor a
SIRS	<i>Systemic Inflammatory Response Syndrome</i>
SMPD1	saure Sphingomyelinase
sSMPD1	sezernierte saure Sphingomyelinase
SOFA	<i>Sequential Organ Failure Assessment</i>
sTNF- $\alpha$ RI und II	löslicher Tumornekrosefaktor alpha Rezeptor I und II
TNF- $\alpha$	Tumornekrosefaktor alpha
VLDL	<i>very low density</i> Lipoprotein

## **Zusammenfassung**

### **Aktivität der sezernierten Sphingomyelinase bei akuter und chronischer systemischer Inflammation am Beispiel des SIRS, der Sepsis und der chronischen Herzinsuffizienz**

**Einleitung** *Systemic inflammatory response syndrome* (SIRS), Sepsis und chronische Herzinsuffizienz (CHF) sind gekennzeichnet durch eine generalisierte Inflamationsreaktion mit Hyperzytokinämie, vermehrtem oxidativen Stress, hämodynamischen und metabolischen Veränderungen. Erste Beobachtungen am Menschen haben gezeigt, dass sich generalisierte Entzündungsprozesse auch in systemischen Veränderungen des Sphingomyelinstoffwechsel niederschlagen. Metabolite des Sphingomyelinstoffwechsel sind an der zellulären Stressantwort beteiligt und greifen regulativ in die unterschiedlichsten Immunfunktionen ein. Daneben lassen sich kardiovaskuläre und metabolische Effekte beobachten. Sphingomyelinasen nehmen als Schrittmacherenzyme eine Schlüsselposition im Sphingomyelinstoffwechsel ein. Welche Rolle der sezernierten Sphingomyelinase (sSMPD1) in einer systemischen Aktivierung des Sphingomyelinstoffwechsels zukommt, ist bisher nur unzureichend untersucht.

**Ziele** Wir gingen der Frage nach, inwieweit akute und chronische generalisierte Inflamationszustände beim Menschen mit einer veränderten Aktivität der sezernierten Sphingomyelinase einhergehen. Darüber hinaus sollte geklärt, ob ein Zusammenhang zwischen Krankheitsschwere und Ausmaß der sSMPD1 Aktivitätsänderung besteht. Dabei untersuchten wir auch mögliche Mechanismen der Aktivitätssteigerung. Schließlich untersuchten wir den Zusammenhang zwischen sSMPD1 Aktivität und verschiedenen Funktionsparametern der chronischen Herzinsuffizienz.

**Material und Methoden** Die Bestimmung der sSMPD1 Aktivität im Blutplasma/-serum erfolgte mit Hilfe eines fluorimetrischen *in house* Assays. In einer prospektiven Longitudinalstudie untersuchten wir den Einfluss zweier kardiochirurgischer Verfahren mit unterschiedlichem Ausmaß der postoperativen Entzündungsreaktion auf die sSMPD1 Aktivität. In einer zweiten prospektiven Longitudinalstudie untersuchten wir die sSMPD1 Aktivität bei schwerer Sepsis oder septischen Schock. Endpunkt der Studie war die Verlegung auf die Normalstation oder der Tod. Im individuellen Verlauf ermittelte Maximalwerte der sSMPD1 Aktivität wurden mit etablierten Krankheitsschweremarkern verglichen. Schließlich untersuchten wir im Rahmen einer Querschnittsstudie die sSMPD1 Aktivität bei chronischer Herzinsuffizienz. Eine Subgruppenanalyse erfolgte in Abhängigkeit vom Kachexiestatus. In



einer Regressionsanalyse wurde u.a. der Zusammenhang zwischen sSMPD1 Aktivität und maximaler Sauerstoffaufnahme unter Belastung, Gefäßreagibilität und Muskelfunktion bestimmt. Zur Untersuchung des Einflusses von oxidativem Stress auf die sSMPD1 Aktivität erfolgte die Inkubation mit einem Radikalbildner. Datenangabe: Mittelwert  $\pm$  Standardfehler.

**Ergebnisse** Die sSMPD1 Aktivität der Referenzgruppe lag im Mittel bei  $150.3 \pm 33.7$  pmol/(ml\*h) (Median 123,6). Die Patienten mit elektivem herzchirurgischen Eingriff wiesen einen signifikanten Anstieg der sSMPD1 Aktivität in Folge der Operation auf. Dieser Anstieg war in der Gruppe mit stärker ausgeprägter Entzündungsreaktion signifikant höher. Im Vergleich zur altersgenormten, gesunden Kontrollgruppe wiesen die Patienten mit schwerer Sepsis oder septischen Schock am Tag der Diagnosestellung signifikant höhere sSMPD1 Aktivitäten auf, Median 262,3 pmol/(ml\*h). Während die sphingolytische Aktivität im Plasma der an Sepsis versterbenden Patienten im Beobachtungszeitraum um 23,8% anstieg, sank die Aktivität in der Subgruppe der Überlebenden um 65,0%. Dieser gegenläufige Aktivitätsverlauf war zwischen den Verstorbenen und Überlebenden signifikant unterschiedlich.

Auch bei Patienten mit chronischem Inflammationszustand (CHF, NYHA I-IV) lag die sSMPD1 Aktivität mit  $299 \pm 27$  pmol/(ml\*h) um >90% höher als in der gesunden Kontrollgruppe und einer zusätzlichen Vergleichsgruppe mit chronischer Hypertonie. Beim Vergleich der Aktivitätswerte unter den verschiedenen NYHA-Klassen zeigte sich im Trend ein schrittweiser Anstieg der Aktivität parallel zur Zunahme des Schweregrades der CHF. Darüber hinaus fanden wir bei kachektischen CHF Patienten ( $405,2 \pm 54,4$  pmol/(ml\*h)) eine signifikant höhere sSMPD1 Aktivität als bei Patienten ohne Kachexie ( $233,2 \pm 24,3$  pmol/(ml\*h)). Bei der univariaten Regressionsanalyse zeigte sich ein signifikant inverser Zusammenhang zwischen sSMPD1 Aktivität und maximaler Sauerstoffaufnahme unter Belastung, der Gefäßreagibilität und der Muskelfunktion. Unter dem direkten Einfluss des Radikalbildners stieg die sSMPD1 Aktivität um  $87,3\% \pm 14,1\%$  an.

**Schlussfolgerungen** Unsere Ergebnisse zeigen erstmals, dass sowohl akute als auch chronische systemische Inflammationszustände mit einem Anstieg der sphingolytischen Aktivität im Blut einhergehen. Verantwortlich hierfür ist eine gesteigerte Aktivität der sezernierten Sphingomyelinase sSMPD1, die am ehesten Folge einer verstärkten Zytokin-induzierten Sekretion aus dem Endothel oder auch Resultat einer Enzymmodifikation unter oxidativen Bedingungen ist. Die Ergebnisse, welche an fast 150 Patienten in drei prospektiven Studien erhoben wurden, deuten auf eine wichtige Rolle von sSMPD1 bei generalisierten Inflammationsreaktionen und in der Pathogenese des Multiorgandysfunktionssyndrom hin.

# 1. Einleitung

## 1.1. Inflammation

Entzündung (engl.: *inflammation*) lässt sich definieren als die „(Abwehr-) Reaktion des Organismus und seiner Gewebe gegen verschiedenartige (schädigende) Reize“ (Noxen) (Pschyrembel 2004). Ziel dieser Reaktion ist es, eine drohende Gewebeschädigung abzuwenden, oder, falls dies nicht möglich ist, den Schaden zu begrenzen und die Folgen im Sinne einer Heilung weitestgehend zu beseitigen. Entzündung erfüllt somit primär eine Schutzfunktion, um die strukturelle und funktionelle Integrität des Organismus zu bewahren. Aus dieser physiologischen Bedeutung der Inflammationsreaktion ergibt sich, dass jede Situation, die für den Organismus eine Bedrohung darstellt und/oder zu einer Gewebeschädigung führt, eine Entzündungsreaktion auslösen kann.

Im Falle einer Infektion mit Bakterien, Viren, Pilzen oder Parasiten wirkt der Kontakt mit einem Fremdanigen als Auslöser für die Entzündungsreaktion (Cohen 2002). Verlauf und Prognose der Infektion werden wesentlich durch Virulenz und Pathogenität des Erregers auf der einen Seite und der Abwehrleistung des Organismus auf der anderen Seite bestimmt.

Aber auch ohne den Kontakt mit einem Fremdanigen kann eine Entzündungsreaktion ausgelöst werden. Im Falle einer Gewebeschädigung lösen Mediatoren, die endogen aus nekrotischen Geweben freigesetzt werden, die Entzündungsreaktion aus (Koch und Funk 2001). Die Gewebesnekrose kann Folge einer physikalischen Noxe (mechanisches, chemisches, thermisches Trauma), Folge einer Ischämie, Folge des zytopathischen Effektes eines Erregers oder Folge des schädigenden Einflusses der eigenen Entzündungsreaktion sein. Hierbei ist die Gewebesnekrose an sich auslösend für das Entzündungsgeschehen. Ausmaß, Verlauf und Prognose der lokalen inflammatorischen Reaktion werden vorwiegend durch Schwere und Lokalisation des Gewebeschadens bestimmt.

An der Entzündungsreaktion selbst sind zahlreiche Mechanismen beteiligt. Neben einer Aktivierung der humoralen und zellulären Abwehr, lassen sich Veränderungen der Hämodynamik, der Gefäßpermeabilität, der Hämostase und des Energiestoffwechsels beobachten (Cohen 2002). All dies wird durch ein kompliziertes Netzwerk aus unzähligen Mediatoren gesteuert und koordiniert.

Nach Aktivierung der Inflammationsprozesse gewinnt die Schadensbegrenzung zentrale Bedeutung (Nathan 2002). Bei Bedrohung durch eine Infektion gilt es eine weitere Erregerproliferation und -ausbreitung abzuwehren. Gleichzeitig muss die gewebschädigende Wirkung der eigenen Inflammationsreaktion auf den Entzündungsherd begrenzt werden. Der

Vielzahl von proinflammatorischen Mediatoren steht hierfür eine Reihe von antiinflammatorischen Molekülen gegenüber, um so ein inflammatorisches Gleichgewicht wahren zu können. Gleichsam von Bedeutung sind die Mechanismen, die nach Beseitigung der auslösenden Noxe den Heilungsprozess einleiten und schließlich zum Abklingen der Entzündungsreaktion führen.

## **1.2. Die Generalisierung der Inflammationsreaktion**

Gelingt es dem Organismus nicht, die Noxe auf lokaler Ebene zu beseitigen oder ist der Gewebeschaden sehr ausgeprägt, bleibt der Entzündungsprozess nicht länger auf den primären Fokus begrenzt (Bone et al. 1997). Stattdessen kommt es zu einer Ausweitung der Inflammationsreaktion. Im Falle einer bakteriellen Infektion kann dies nach Freisetzung von Erregerbestandteilen oder Eindringen des Erregers in die Blutbahn geschehen. Lässt sich der Erreger in der Folge im Blut nachweisen, spricht man von einer Bakteriämie.

Aber auch ohne die Invasion eines Erregers in den Systemkreislauf kann es in Reaktion auf einen mikrobiologischen Stimulus oder einen schweren Gewebeschaden durch Freisetzung von Entzündungsmediatoren ins Blut zu einer systemischen Aktivierung des Immunsystems kommen (Matot und Sprung 2001). Auf diesem Weg freigesetzte proinflammatorische Mediatoren sorgen dafür, dass weitere Entzündungszellen an den Entzündungsort rekrutiert werden und der Organismus somit in angemessener Weise auf den schädigenden Stimulus reagieren kann (Weigand et al. 2004). Gleichzeitig und verzögert freigesetzte antiinflammatorische Mediatoren greifen regulierend in die systemische Inflammationsantwort ein, um so eine übermäßige Aktivierung des Immunsystems und deren negativen Folgen zu verhindern.

Unter gewissen Umständen, die im Zusammenhang mit der Schwere des schädigenden Stimulus, seiner Persistenz oder einer vorbestehenden Schwächung vitaler Körperfunktionen stehen, kann es zu einer Störung dieses immunologischen Gleichgewichts kommen (Bone et al. 1997). Anstelle einer angemessenen Reaktion kommt es zu einer massiven systemischen Aktivierung des Immunsystems mit Verlust der immunologischen Balance. Dabei wird der Körper von einer Vielzahl pro- und antiinflammatorischer Mediatoren überschwemmt, die von aktivierten Entzündungszellen, insbesondere Monozyten/Makrophagen und neutrophilen Granulozyten freigesetzt werden. Zytokine initiieren eine Akute Phase Reaktion, in deren Rahmen die Syntheseleistung der Leber an die systemische Inflammationsreaktion angepasst wird, und die Leber mit der Freisetzung entzündlicher Effektoren und protektiver Substanzen

reagiert (Gabay und Kushner 1999).

Infolge der immunologischen Dysbalance resultieren sowohl Phasen der Hyperinflammation als auch der Immunsuppression (Weigand et al. 2004). Während der Hyperinflammation überwiegen proinflammatorische Zytokine wie Tumornekrosefaktor alpha ( $\text{TNF-}\alpha$ ), Interleukin-1beta ( $\text{IL-1}\beta$ ), Interleukin-6 ( $\text{IL-6}$ ) und Interferon-gamma ( $\text{IFN-}\gamma$ ). Gleichzeitig kommt es zu einer verstärkten Bildung von Sauerstoffradikalen und der Freisetzung von Proteasen durch aktivierte neutrophile Granulozyten. Phasen der Immunsuppression gehen mit erhöhten Konzentrationen von Interleukin 10, Interleukin 4, und löslichen Zytokinrezeptoren wie Tumornekrosefaktor-Rezeptor I und II ( $\text{sTNF-}\alpha$  RI und II) und Interleukin 1 Rezeptor a ( $\text{sIL-1Ra}$ ) einher und prädisponieren für Sekundärinfektionen (Weigand et al. 2004).

Infolge der unkontrollierten systemischen Ausweitung der Inflamationsreaktion können die Entzündungsmediatoren und aktivierten Entzündungszellen ihre zerstörerische Wirkung jetzt auch fern ab vom entzündungsauslösenden Fokus entfalten (Cohen 2002, Marshall 2001). Primär gesundes Gewebe sowie vom primären Fokus entfernt liegende Organsysteme werden in den Entzündungsprozess einbezogen und geschädigt. Auf zellulärer Ebene reagiert das in die Inflamationsreaktion einbezogene Gewebe mit einer Stressantwort, die mit Veränderungen in zahlreichen Stoffwechselkaskaden einhergeht (Koch und Funk 2001). Endothelzellaktivierung und dissimierte intravasale Gerinnung bewirken Störungen auf Ebene der Mikrozirkulation (Marshall 2001). Eine globale Hypotension verstärkt die Minderperfusion der Gewebe. Ischämie, hypoxischer Gewebeschaden und Reperfusionsschaden sind die Folge. Gewebehypoxie, vermehrter oxidativer Stress und die konsekutive Gewebesnekrose können dann wiederum selbst als Auslöser einer Entzündungsreaktion wirken, die systemische Inflamationsreaktion auch nach Beseitigung der initialen Noxe unterhalten und verstärken (Karimova und Pinsky 2001, Closa und Folch-Puy 2004). Neben nekrotischem Gewebsuntergang steigt die Apoptoserate in parenchymatösem Gewebe (Hotchkiss et al. 1999). Schließlich kann eine empfindliche Störung der Homöostase in den verschiedenen Organsystemen resultieren, die in einem vital bedrohlichen Multiorganversagen mündet.

### 1.3. SIRS, Sepsis, schwere Sepsis und septischer Schock

#### 1.3.1. Definition

Die klinische Manifestation der beschriebenen generalisierten Immunaktivierung wird unabhängig vom initialen Auslöser als *systemic inflammatory response syndrome* (SIRS) bezeichnet (Levy et al. 2003). Als Auslöser kommen sowohl lokale und systemische Infektionen als auch nicht-infektiöse Erkrankungen wie akute Pankreatitis, Polytrauma, Verbrennungen und Folgezustände großer operativer Eingriffe in Frage.

Insbesondere nach kardiochirurgischen Eingriffen treten gehäuft Zustände mit generalisierter Inflamationsreaktion auf (Wan et al. 1997). Trotz wesentlicher Weiterentwicklung der operativen Verfahren sowie der zum Einsatz kommenden Gerätetechnik, sind diese Eingriffe weiterhin von hoher Invasivität und ausgeprägtem chirurgischem Trauma gekennzeichnet. Dabei wird vor allem der Einsatz der extrakorporalen Zirkulation (kardiopulmonaler Bypass) in Zusammenhang mit einer gesteigerten Immunaktivierung und vermehrtem oxidativen Stress gebracht. Ursachen hierfür werden, unter anderem, im Kontakt mit Fremdoberflächen, in der mechanischen Beanspruchung der korpuskulären Blutbestandteile, in Schwankungen der Körpertemperatur und in einer veränderten Hämodynamik gesehen (Wan et al. 1997). Neuere Verfahren versuchen das chirurgische Trauma zu minimieren sowie die temporäre Stilllegung des Herzmuskels, den resultierenden Reperfusionsschaden und damit das konsekutive Postperfusionssyndrom zu vermeiden (Vallely et al. 2001).

Im Jahr 1992 legte die *Consensus Conference* des *American College of Chest Physicians* und der *Society of Critical Care Medicine* erstmals klinische Kriterien für die Diagnose eines SIRS fest (Bone et al. 1992). Demnach geht man vom Vorliegen einer generalisierten Inflammation im Sinne eines SIRS aus, wenn mindestens zwei der folgenden vier Kriterien erfüllt sind: (1) Körpertemperatur von  $\leq 36^{\circ}\text{C}$  oder  $\geq 38^{\circ}\text{C}$ , (2) Herzfrequenz von  $\geq 90/\text{min}$ , (3) Hyperventilation mit einer Atemfrequenz von  $\geq 20/\text{min}$  oder einem  $\text{PaCO}_2 \leq 33\text{mmHg}$ , (4) Leukozytenzahl von  $\leq 4000$  oder  $\geq 12000$  Zellen/ $\mu\text{l}$  oder  $\leq 10\%$  unreife Neutrophile im Differentialblutbild.

Kann ein Erreger als Ursache für die systemische Inflamationsreaktion nachgewiesen werden oder ist aufgrund des klinischen Bildes eine Infektion wahrscheinlich, spricht man von Sepsis. In Abhängigkeit von der Schwere des klinischen Bildes unterscheidet man zwischen Sepsis, schwerer Sepsis und septischen Schock. Liegt mindestens eine Organdysfunktion vor, wird eine schwere Sepsis angenommen. Beim septischen Schock handelt es sich um ein akutes Kreislaufversagen mit persistierender arterieller Hypotension

trotz adäquater Volumentherapie (detaillierte Darstellung der Kriterien in Tabelle 1, Anhang).

### *1.3.2. Epidemiologie*

Basierend auf diesen Kriterien konnten epidemiologische Studien zeigen, dass die schwere Sepsis und der septische Schock die Haupttodesursache auf nicht-kardiologischen Intensivstationen darstellen (Reinhart und Brunkhorst 2002). Demnach erkrankten in den USA jährlich ca. 750.000 Patienten an einer Sepsis. Das entspricht einer Inzidenz von 300 Fällen mit schwerer Sepsis und septischem Schock pro 100.000 Einwohnern (Angus et al. 2001). Damit liegt die Inzidenz der Sepsis noch vor der von Herzinsuffizienz, Dickdarmkrebs, Brustkrebs und AIDS (240, 50, 110, 17) (Brunkhorst 2004). Gleichzeitig steigt die Letalität mit zunehmendem Schweregrad und liegt für die schwere Sepsis und den septischen Schock zwischen 18% und 82% (Matot und Sprung 2001). In Deutschland ermittelte eine 2003/04 durchgeführte Prävalenzstudie eine Inzidenz von 116 pro 100.000 Einwohnern für die Sepsis bzw. 110 pro 100.000 Einwohnern für die schwere Sepsis (Brunkhorst 2006). Die häufigsten Infektionsfoci bei Patienten mit schwerer Sepsis waren Atemwegsinfektionen (63%) und intraabdominelle Infektionen (25%).

### *1.3.3. Monitoring der Inflammationsreaktion*

Im Vordergrund des klinischen Managements der Sepsis steht die frühzeitige Diagnosestellung, das Erkennen einer Organdysfunktion sowie das schnelle Einleiten einer adäquaten Therapie (Brunkhorst et al. 2002). In diesem Zusammenhang stellen Fieber oder Hypothermie, Leukozytose oder Leukopenie, Tachykardie, Hypotonie und alveoläre Hyperventilation zwar sensitive klinische Zeichen für eine generalisierte Inflammation dar, eine Differenzierung zwischen infektiöser oder nicht-infektiöser Ätiologie, eine Aussage über Ausmaß der Organdysfunktion und Prognose lassen diese Parameter jedoch nicht zu. Bakterienkulturen aus Blut und anderen Körperflüssigkeiten gelten als unzureichendes Verfahren, um eine Infektion valide und frühzeitig zu diagnostizieren. Um ein genaueres Bild über Immunstatus, Organfunktion und Stoffwechselleistung eines Patienten mit systemischer Inflammation zu erhalten, ist der Kliniker auf zusätzliche klinische und paraklinische Parameter angewiesen (Weigand et al. 2003, Levy et al. 2003). Insbesondere durch die Bestimmung zusätzlicher, inflammatorischer und biochemischer Marker, wie verschiedene Zytokine, Akute-Phase-Proteine und das Prohormon Procalcitonin, versucht man die Wirtsantwort zunehmend besser zu charakterisieren und Rückschlüsse für eine

adäquate Therapie zu gewinnen (Marshall et al. 2003). Daneben spielt das intensivmedizinische Monitoring der Organfunktionen eine wichtige Rolle im frühzeitigen Erkennen von Organdysfunktionen (Marshall et al. 1995). Eine Reihe von Scoring Systemen dient hierbei der genaueren Beschreibung des Schweregrades, des Verlaufs und der Prognose der Organdysfunktionen und des septischen Krankheitsbildes im Allgemeinen. Beispiele für entsprechend validierte Scoring Systeme sind der Acute Physiology and Chronic Health Evaluation II (APACHE II) Score und der Sequential Organ Failure Assessment (SOFA) Score (Rosenberg 2002).

Auf dem Weg zu einer exakteren Beschreibung des klinischen Bildes sowie einer besseren Risikostratifizierung der Patienten mit systemischer Inflammation wurde ein Konzept vorgeschlagen, dass eine genaue Beurteilung von Prädisposition, Infektionsstatus, Inflamationsreaktion und Organdysfunktion vorsieht (Levy et al. 2003, Brunkhorst 2004). Allerdings ist die Evaluierung der genomischen, mikrobiellen und molekularbiologischen Parameter dieses sogenannten PIRO-Konzeptes (Prädisposition, Infektion, Reaktion, Organdysfunktion) weiterhin Gegenstand der Forschung. Eine Einführung in die klinische Routine steht deshalb bisher noch aus.

Die Mechanismen, über die die systemische Inflamationsreaktion in die Organfunktionen eingreift, sind komplex und bisher nur teilweise verstanden (Marshall 2001). Von besonderer Bedeutung für die Pathogenese der Organdysfunktion scheinen die Auswirkungen der Inflamationsreaktion auf Mikrozirkulation und globale Hämodynamik zu sein. Die Auswirkungen der systemischen Inflamationsreaktion auf das kardiovaskuläre System gehören damit zu den wesentlichen Determinanten von Morbidität und Mortalität bei SIRS und Sepsis (Krishnagopalan et al. 2002).

#### **1.4. Wechselwirkungen zwischen systemischer Inflammation und kardiovaskulärem System**

*Calor*, *rubor* und *tumor* gehören zu den Kardinalsymptomen einer jeden lokalen Entzündungsreaktion. Alle drei Symptome sind Ausdruck von umschriebenen Veränderungen der Gewebepерfusion und Gefäßpermeabilität. Die Steuerung dieser Veränderungen obliegt dabei den verschiedenen Mediatoren, die im Rahmen des Entzündungsgeschehens freigesetzt werden.

Im Falle einer systemischen Entzündungsreaktion wie der Sepsis können diese Entzündungsmediatoren ihre Wirkung am gesamten Kreislaufsystem entfalten und zu einer

schweren Beeinträchtigung von Gefäßsystem und Herzfunktion führen (Ruokonen et al. 2002). Kompensationsmechanismen wie eine Aktivierung des sympathoadrenergen Systems und des Renin-Angiotensin-Systems sowie eine vermehrte Freisetzung von Vasopressin erschöpfen sich oder bleiben wirkungslos (Landry und Oliver 2001). Im schlimmsten Fall resultiert das Vollbild des septischen Schocks mit entsprechend ausgeprägten kardiozirkulatorischen Veränderungen.

Exzessive periphere Vasodilatation und eine erhöhte Gefäßpermeabilität lassen eine relative und absolute Volumenmangelsituation entstehen (Bloos und Reinhart 2002). Gleichzeitig kommt es im Rahmen einer als septische Kardiomyopathie bezeichneten myokardialen Dysfunktion zu einer verminderten Kontraktilität und gestörten Compliance des Herzmuskels (Krishnagopalan et al. 2002). Die Beeinträchtigung von Kontraktilität und Compliance äußert sich in einer verminderten Ejektionsfraktion und einer biventrikulären Dilatation. Schlagvolumen und kardialer Index können dagegen unverändert bleiben. Entscheidend ist, dass die Herzleistung nicht an die metabolischen Erfordernisse der Peripherie angeglichen werden kann.

Von zentraler Bedeutung für die Entstehung dieser myokardialen Dysfunktion scheinen vor allem die beiden proinflammatorischen Zytokine TNF- $\alpha$  und IL-1 $\beta$  zu sein (Cain et al. 1999). Beide nehmen eine wichtige Rolle in der Pathogenese des septischen Krankheitsbildes ein. Gleichzeitig besitzen TNF- $\alpha$  und IL-1 $\beta$  einen eigenständigen und synergistischen kardiodepressiven Effekt. Die jeweils nachgeschalteten Mechanismen, die für die Vermittlung der kardiodepressiven Wirkung verantwortlich sind, sind noch nicht abschließend geklärt. Von Bedeutung in der Signaltransduktion der Zytokinwirkung scheinen die Synthese von NO durch die konstitutive wie auch die induzierbare NO-Synthetase, eine Störung der  $\beta$ 1-Adrenorezeptor vermittelten Wirkung und nach neueren Erkenntnissen auch eine Aktivierung des Sphingomyelinstoffwechsels zu sein (Favory et al. 2004). Eine Störung der Calcium-Homöostase aber auch eine erhöhte Apoptose der kardialen Myozyten sind die Konsequenz und münden in der beschriebenen kardialen Dysfunktion.

Die kardiozirkulatorische Insuffizienz im septischen Schock entsteht folglich aus einer Kombination aus Hypovolämie, gestörter Vasoreagibilität mit Blutverteilungsstörungen und myokardialer Dysfunktion (Ruokonen et al. 2002). Refraktäre Hypotension gepaart mit Veränderungen auf der Ebene der Mikrozirkulation führen dann zu ausgeprägten Perfusionsstörungen in den verschiedenen Organsystemen und tragen vermutlich wesentlich zur Entstehung der Organdysfunktion und des Multiorganversagens bei. Eine intestinale



Perfusionsstörung kann zudem eine bakterielle Translokation aus dem Darm verursachen und sich in Form einer Endotoxinämie manifestieren (Brunkhorst et al. 2002). Gleichzeitig wirken globale Gewebehypoxie, der resultierende oxidative Stress und der Gewebeschaden als Stimuli für die Zytokinfreisetzung und unterhalten und verstärken so die systemische Inflammation (Karimova und Pinsky 2001, Closa und Folch-Puy 2004).

### **1.5. Inflammation und Herzinsuffizienz – Herzinsuffizienz und Inflammation**

Die Wechselwirkung zwischen kardiozirkulatorischer Insuffizienz und systemischer Inflammation findet sich in ähnlicher Form auch in der Pathophysiologie der chronischen Herzinsuffizienz wieder (von Haehling et al. 2004). Ausgangspunkt in der Entstehung der chronischen Herzinsuffizienz ist die kardiale Schädigung, die Folge einer chronischen Hypertonie, einer Koronarsklerose, Klappenerkrankung oder einer Kardiomyopathie sein kann. Es resultiert eine Einschränkung der Pumpfunktion, in deren Folge sich weitestgehend unabhängig von der Ätiologie der kardialen Schädigung eine Reihe von kardialen und extrakardialen Veränderungen vollziehen, die sich wechselseitig beeinflussen, verstärken und dabei entscheidenden Einfluss auf das Fortschreiten des Krankheitsprozesses gewinnen (Mann und Bristow 2005). Dementsprechend wird die chronische Herzinsuffizienz heutzutage nicht mehr lediglich als eine einfache Störung der kardialen Pumpfunktion gesehen, sondern als eine komplexe Multisystemerkrankung verstanden, die mit Veränderungen auf Ebene des muskuloskeletalen, des renalen, des neuroendokrinen Systems und des Immunsystems einhergeht (von Haehling et al. 2004).

Vor allem Veränderungen in den verschiedenen neurohumoralen Systemen scheinen von zentraler pathophysiologischer Bedeutung für Symptomatik und Progression der chronischen Herzinsuffizienz zu sein (Mann und Bristow 2005). Neben der Aktivierung des sympathoadrenergen Systems und des Renin-Angiotensin-Systems lässt sich eine generalisierte, chronische Immunaktivierung beobachten (Rauchhaus und Müller-Werdan 2001). Diese Immunaktivierung spiegelt sich unter anderem in erhöhten Plasmakonzentrationen des Akute-Phase-Proteins C-reaktives Protein (CRP) und der proinflammatorischen Zytokine  $\text{TNF-}\alpha$ ,  $\text{IL-1}\beta$  und  $\text{IL-6}$  wieder. Erhöhte Zytokinkonzentrationen finden sich dabei sowohl bei Patienten mit idiopathischer dilatativer Kardiomyopathie als auch bei Patienten mit ischämisch bedingter Herzinsuffizienz (Aukrust et al. 1999). Dabei weisen die inflammatorischen Zytokine wie auch ihre löslichen Rezeptoren mit zunehmender Schwere der Herzinsuffizienz steigende Konzentrationen auf

und besitzen unabhängig von Funktionsparametern prognostische Aussagekraft (Rauchhaus et al. 2000). Dies gilt insbesondere für sTNF- $\alpha$  RI, der bei einem Vergleich mit anderen Immunparametern die höchste statistische Genauigkeit bei der Letalitätsprognose aufwies. Dies wird auf seine vergleichsweise lange Halbwertszeit und geringe intraindividuelle Variabilität zurückgeführt.

Ähnlich wie bei SIRS und Sepsis, wenn auch in vermindertem Ausmaß, scheinen Gewebehypoxie, oxidativer Stress und bakterielle Translokation mit konsekutiver Endotoxämie an der Zytokinfreisetzung beteiligt zu sein (Rauchhaus und Müller-Werdan 2001). Die im Rahmen der linksventrikulären Dysfunktion gesteigerte Ventrikelwandspannung löst zudem eine myokardiale TNF- $\alpha$  Produktion aus, die ebenfalls zur Steigerung der Zytokinkonzentrationen im Blut beitragen könnte. Auch ein Einfluss der autonomen Dysbalance auf die Zytokinproduktion wird diskutiert.

Die so freigesetzten Zytokine unterhalten einen chronischen Inflammationszustand, der durch Förderung von myokardialer Depression, kardialem Remodeling, endothelialer Dysfunktion, Insulinresistenz, peripherer Myopathie und Kachexie wohlmöglich wesentlichen Anteil am Fortschreiten der chronischen Herzinsuffizienz hat (Parissis et al. 2002, Anker et al. 1997a).

### **1.6. Antizytokintherapien bei Sepsis und Herzinsuffizienz**

Steigende Zahlen an Hochrisikopatienten in der Chirurgie, eine zunehmende Invasivität in der Intensivmedizin, ein Rückgang in der Frühsterblichkeit der koronaren Herzkrankheit und die demographischen Veränderungen einer alternden Gesellschaft haben entscheidend dazu beigetragen, dass die Inzidenz von Sepsis und chronischer Herzinsuffizienz in den letzten Jahren stets zugenommen hat (Moerer und Burchardi 2004, Rauchhaus und Müller-Werdan 2001). Diese Zunahme und eine aufwändige, kostenintensive Therapie lassen beide Krankheitsbilder zu einem großen gesellschaftlichen und gesundheitsökonomischen Problem werden.

Gleichzeitig ist die Prognose der schweren Sepsis und der chronischen Herzinsuffizienz trotz Fortschritten in der Therapie weiterhin häufig nur begrenzt beeinflussbar. Versuche in die systemischen Inflammationsprozesse auf Ebene des Zytokinnetzwerkes modulierend einzugreifen, haben bisher weder in der Behandlung des SIRS und der Sepsis noch in der Behandlung der Herzinsuffizienz wesentliche Erfolge gebracht (Weigand et al. 2003, von Haehling et al. 2004). Das generelle Scheitern von Antizytokinstrategien, bei der die Wirkung einzelner Zytokine ausgeschaltet werden soll, wird unter anderem mit der Redundanz und Pleiotropie des Zytokinnetzwerkes erklärt (Papathanassoglou et al. 2000).

Stattdessen erscheint die Einflussnahme auf nachgeschaltete Stoffwechselwege, auf die die Zytokineffekte konvergieren und die näher an den negativen Auswirkungen der systemischen Inflamationsreaktion sind, als besser kontrollierbar und vielversprechender in der Entwicklung neuer Therapiekonzepte. Ein Beispiel hierfür ist der Einsatz von aktiviertem Protein C, welches die negativen Auswirkungen der Inflamationsreaktion auf das Gerinnungssystem abschwächen kann (Vincent et al. 2005).

Ein weiterer dem Zytokinnetzwerk nachgeschalteter Stoffwechselweg umfasst den der Sphingolipide, die sowohl Einfluss auf den Prozess der transmembranären Signaltransduktion als auch auf die sich daran anschließenden Wirkungen von Zytokinen nehmen.

### 1.7. Sphingolipide

Neben Glycerolipiden und Sterolen bilden Sphingolipide eine der drei Hauptgruppen in der großen Familie der Membranlipide (Futerman und Hannun 2004). Als J.L.W. Thudichum 1884 die Gruppe der Sphingolipide erstmals beschrieb, wählte er einen Namen in Anlehnung an den griechischen Mythos der Sphinx, um so den vielen Rätseln, die diese Lipidspezies der Wissenschaft aufgab, Ausdruck zu verleihen. Erst vor gut 15 Jahren begann man zu verstehen, dass es sich bei den Sphingolipiden nicht nur um inerte Strukturkomponenten von zellulären Membranen handelt (Baumruker und Prieschl 2002). Vielmehr ist heute bekannt, dass die große Gruppe der Sphingolipide eine Vielzahl von potenten bioaktiven Lipiden umfasst, die in unterschiedlichster Weise an der Regulation des Zellstoffwechsels beteiligt sind. So sind Sphingolipide in die Steuerung von Prozessen der Zelldifferenzierung, -proliferation, -alterung und Apoptose involviert. Sowohl durch ihre Wirkung als *first* und *second messenger* als auch durch ihre zentrale Rolle bei der Ausbildung von Mikrodomänen in Zellmembranen, sogenannten *rafts*, nehmen sie dabei direkt und indirekt Einfluss auf zahlreiche Signalkaskaden der Zelle (Prieschl und Baumruker 2000).

Trotz einer ganzen Reihe an neuen Erkenntnissen weist der Sphingolipidstoffwechsel eine derartige Komplexität auf, dass viele Fragen im Zusammenhang mit seiner Regulation und der jeweiligen Funktion einzelner Sphingolipide bisher unbeantwortet geblieben sind (Futerman und Hannun 2004). Neben der strukturellen Vielfalt der Sphingolipide - die Gruppe der Sphingolipide umfasst insgesamt ca. 400 Strukturvarianten - tragen weitere Eigenschaften des Sphingolipidstoffwechsels zur beschriebenen Komplexität bei. So ist der Sphingolipidstoffwechsel durch einen hohen Vernetzungsgrad charakterisiert (Hannun et al. 2001). Ausgehend von einzelnen Metaboliten können ganz unterschiedliche

Stoffwechselwege eingeschlagen werden. Durch lediglich geringe Modifikationen können Sphingolipide mit teilweise antagonistischem Wirkungsprofil entstehen. Diese Wirkung kann wiederum in Abhängigkeit vom Zelltyp, vom Zellzyklus und von der subzellulären Lokalisation der gebildeten Lipide ganz unterschiedlich ausfallen. Hinzu kommt, dass Signalstoffe, die an der Regulation des Sphingolipidstoffwechsels beteiligt sind, in der Regel an mehreren Stellen dieses Stoffwechsels eingreifen und die Synthese oder den Abbau von verschiedenen Sphingolipiden beeinflussen. Entsprechend wurde für die Wirkung von Veränderungen im Sphingolipidstoffwechsel das Konzept eines Rheostats formuliert (Prieschl und Baumruker 2000). Demzufolge bestimmt die Richtung, in welche das Gleichgewicht der antagonistisch wirkenden Sphingolipide abweicht, die resultierende Wirkung.

### **1.8. Sphingomyelinasen und der Sphingomyelinstoffwechsel**

All dies unterstreicht die Bedeutung einer exakten Steuerung und Koordination der einzelnen Syntheseschritte des Sphingolipidmetabolismus. Eine Schlüsselrolle in der Steuerung des Sphingolipidstoffwechsels fällt dabei den Sphingomyelinasen zu (Goni und Alonso 2002).

Sphingomyelinasen sind Phospholipase-ähnliche Enzyme und spalten das inerte Membranlipid Sphingomyelin in Phosphocholin und Ceramid. Sphingomyelin macht ca. 25% der Lipide in Zellmembranen aus und findet sich in besonders hoher Konzentration in spezialisierten Membrandomänen (Cremasti et al. 2002, Zachowski 1993). Über 85% sind in der äußeren Lipidschicht lokalisiert. Darüber hinaus stellen Lipoproteine eine weitere Quelle für Sphingomyelin dar (Nilsson und Duan 2006). Sphingomyelin macht ca. 20% des Gesamtplasma-Phospholipidpools aus, wobei 63-75% des Plasma-Sphingomyelins in *low density* Lipoprotein (LDL) und *very low density* Lipoprotein (VLDL) enthalten ist.

Im Gegensatz zum Sphingomyelin ist Ceramid ein hochpotenter Mediator und steht quasi im Zentrum des Sphingolipidstoffwechsels (Abb. 1). Die Ceramidgenerierung ist prinzipiell als Folge sowohl einer vermehrten *de novo* Synthese als auch einer gesteigerten sphingolytischen Aktivität denkbar (Gulbins und Kolesnick 2003). Allerdings stellt der Abbau des Sphingomyelins über eine Aktivierung der Sphingomyelinasen einen besonders schnellen Weg für einen transienten Konzentrationsanstieg des Ceramids dar.

Bisher sind in Eukaryonten sechs Isoenzyme in der Gruppe der Sphingomyelinasen beschrieben worden (Goni und Alonso 2002). Diese unterscheiden sich im Wesentlichen in ihrer zellulären Lokalisation, notwendigen Aktivierungsmechanismen und Reaktionsbedingungen wie pH-Optimum und Kofaktoren.

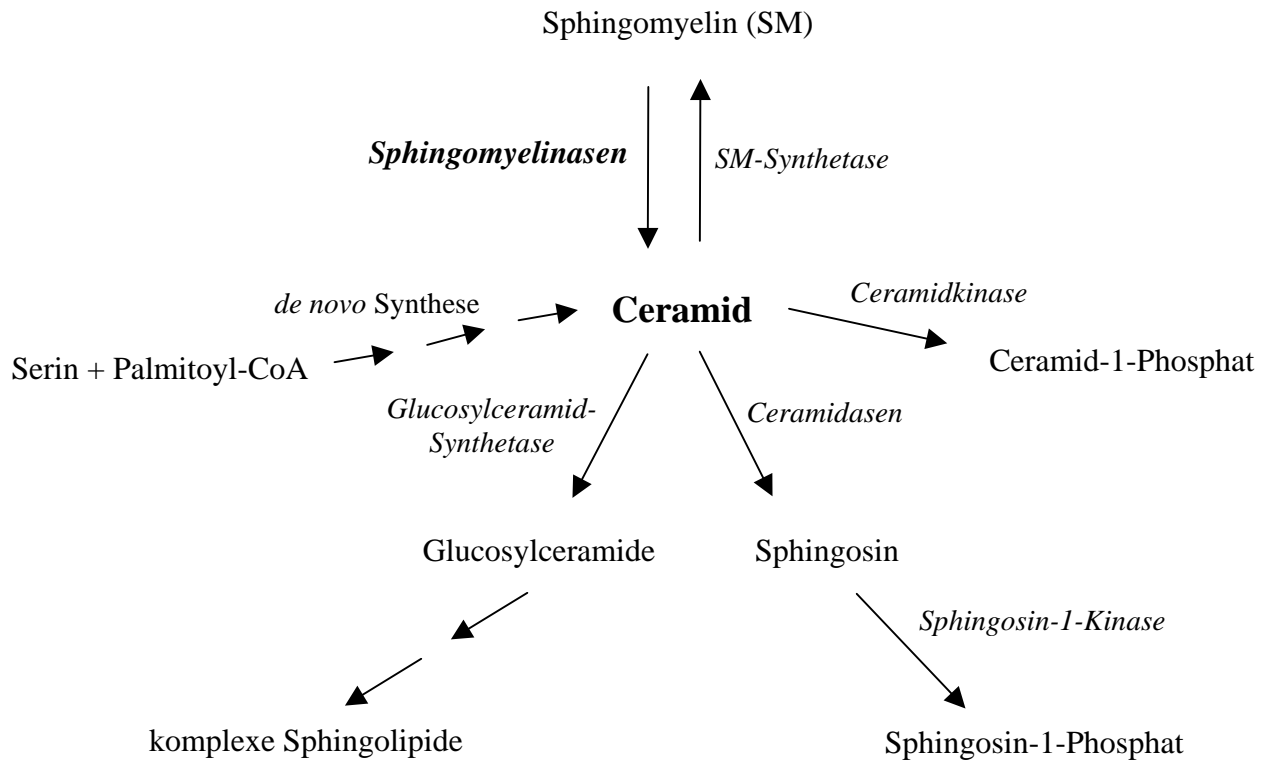


Abb. 1: Übersicht über den Sphingomyelinstoffwechsel

### 1.9. Die saure Sphingomyelinase und ihre Isoformen

Bei dem am besten charakterisierten Isoenzym handelt es sich um die saure Sphingomyelinase (SMPD1)<sup>1</sup> mit einem pH-Optimum bei pH 5.0 und einem ungefähren Molekulargewicht um 70 kDa. Bei einem Defekt des *smpd1* Gens resultiert als pathologisches Korrelat ein den Speicherkrankheiten zugeordnetes Krankheitsbild, das sogenannte Niemann-Pick Syndrom (Hannun et al. 2001). Die Progression der Erkrankung ist mit dem Ausmaß des Aktivitätsverlustes assoziiert. Diese Beobachtung wie auch das saure pH-Optimum weisen auf die lysosomale Lokalisation des Enzyms und seine Bedeutung im Abbau von Membranbestandteilen hin.

Interessanterweise finden sich Isoformen des *smpd1* Genprodukts aber auch außerhalb des Lysosoms und scheinen dabei in verschiedene Signaltransduktionswege eingebunden zu sein (Tabas 1999). So berichteten Schissel et al. 1996 erstmals von einer sezernierten Isoform, der sogenannten sezernierten Sphingomyelinase (sSMPD1) (Schissel et al. 1996a). Für eine ganze

<sup>1</sup> Abkürzung entsprechend der Klassifikation als Sphingomyelinphosphodiesterase 1 (EC 3.1.4.12)

Reihe von Zelltypen, darunter Fibroblasten, Makrophagen und Endothelzellen, konnte die Sekretion der sSMPD1 nachgewiesen werden (Schissel et al. 1996b, Marathe et al. 1998). Lysosomale und sezernierte Isoform gehen aus einem gemeinsamen Precursorprotein hervor (Schissel et al. 1998a). Im Sinne eines differentiellen Proteintransports wird das für die Sekretion bestimmte Protein vom konkurrierenden, lysosomalen Weg in Richtung Golgi-Apparat abgelenkt. Der Transport in Richtung Lysosom erfolgt sowohl über ein Mannose-6-Phosphat Shuttlesystem als auch einen Sortilin vermittelten Weg (Ni und Morales 2006). Auf dem Weg zum Golgi-Apparat unterliegt das Enzym einer andersartigen Prozessierung, so dass die sSMPD1 im Vergleich zur lysosomalen Isoform einen veränderten N-Terminus und ein anderes Glykosilierungsmuster aufweist. Bei beiden Isoformen handelt es sich um Zinkmetalloenzyme. Während das lysosomale Enzym aber vermutlich bereits auf seinem Weg über das Mannose-6-Phosphat Shuttlesystem stärker mit Zinkionen aufgesättigt wird, lässt sich für die sSMPD1 eine relative Abhängigkeit von exogen zugefügtem Zink beobachten. Diese Abhängigkeit von zusätzlichen Zinkionen soll allerdings lediglich eingeschränkt für die von Endothelzellen sezernierte Form gelten (Marathe et al. 1998).

Überhaupt scheinen Endothelzellen eine der Hauptquellen der sSMPD1 zu sein (Tabas 1999). Endothelzellen weisen sowohl eine apikale Freisetzung ins Blut als auch eine basolaterale Sekretion Richtung Gefäßwand auf. Dabei wirken die proinflammatorischen Mediatoren IL-1 $\beta$ , IFN- $\gamma$ , Interferon beta (IFN- $\beta$ ), TNF- $\alpha$ , *platelet activating factor* (PAF) und das bakterielle Endotoxin als Stimulus für die Sekretion der sSMPD1 (Marathe et al. 1998, Wong et al. 2000, Göggel et al. 2004). Erste Untersuchungen zur Rolle der sSMPD1 bei Entzündungsprozessen beschäftigten sich vor allem mit der Beteiligung der sSMPD1 bei der Atherogenese (Schissel et al. 1996a, Marathe et al. 1999). Areale mit saurem pH innerhalb von atheromatösen Plaques schaffen optimale Voraussetzungen für die Entfaltung der sphingolytischen Aktivität der sSMPD1. Allgemein lässt sich im Rahmen eines jeden Entzündungsgeschehens ein vermehrter Anfall saurer Valenzen beobachten. Vor dem Hintergrund einer möglichen physiologischen Bedeutung der ins Blut sezernierten sSMPD1 ist es aber wichtig festzuhalten, dass die Azidität des Reaktionsmilieus nicht zwingende Voraussetzung für die Aktivität dieses Enzyms ist (Tabas 1999). Callahan et al. konnten zeigen, dass ein saurer pH lediglich für die Substrat-Enzym-Bindung von Bedeutung ist, nicht aber für den hydrolytischen Prozess an sich (Callahan et al. 1983). Schissel et al. konnten zeigen, dass unter Bedingungen einer optimalen Substratpräsentation die sSMPD1 ihre sphingolytische Aktivität auch bei neutralem pH entfalten kann (Schissel et al. 1998b).

Hierbei wirkt vor allem ein hohes Sphingomyelin/Phospholipid Verhältnis, wie sie in atherogenen Lipoproteinen oder auch in erwähnten *rafts* zu finden ist, günstig. Die vermehrte Hydrolyse des in den subendothelialen LDL enthaltenen Sphingomyelins durch die sSMPD1 fördert die Aggregation und Retention dieser Lipoproteine (Schissel et al. 1996a). Inwieweit die sezernierte Sphingomyelinase direkt im Sinne einer autokrinen oder parakrinen Wirkung auf den zellulären Sphingomyelinstoffwechsel zurückwirkt, ist bisher allerdings unbeantwortet (Tabas 1999).

In diesem Zusammenhang steht möglicherweise die Beobachtung einer dritten Sublokalisierung der SMPD1 (Cremesti et al. 2002). So wurde eine SMPD1 beschrieben, die mit sphingomyelinhaltigen *rafts* assoziiert ist. Diese *rafts* sind auf der antizytosolischen und somit auch der extrazellulären Membranseite lokalisiert. Verschiedene Stimuli – darunter der FasLigand – führen zu einer Translokation von SMPD1 aus intrazellulären Kompartimenten zur Zellmembran, wo sich die SMPD1 mit *rafts* assoziiert. Durch die Spaltung des in den *rafts* enthaltenen Sphingomyelins zu Ceramid kommt es zur Ausbildung von spezialisierten Membrandomänen, die das *clustering* von Rezeptormolekülen begünstigen. Somit ist die saure Sphingomyelinase auch direkt an der transmembranösen Signaltransduktion beteiligt. Ob es sich hierbei um eine eigene Isoform der SMPD1 handelt, oder sich die sphingolytische Aktivität von der lysosomalen oder noch wahrscheinlicher von der sezernierten Isoform rekrutiert, ist bisher nicht geklärt (Gulbins und Kolesnick 2002).

### **1.10. Studienlage zur sSMPD1 Aktivität im Blut**

Gleichsam ist die genaue Bedeutung des ins Blut sezernierten Anteils der sSMPD1 bis heute unklar. Wong et al. konnten zeigen, dass es in der Maus im Rahmen eines induzierten Endotoxinschocks zu einem Anstieg der sSMPD1 Aktivität im Serum kommt (Wong et al. 2000).

Mit Ausnahme der vorliegenden Arbeit gibt es bisher lediglich drei Studien, die die Aktivität der sSMPD1 in humanen Blutproben direkt untersucht und einen Zusammenhang mit einem Krankheitsgeschehen beschrieben haben. In allen drei Fällen handelt es sich um Studien mit geringer Fallzahl. Gorska et al. konnten signifikant erhöhte sSMPD1 Aktivitäten im Serum von Typ 2 Diabetikern nachweisen (n=12) (Gorska et al. 2003). Sathishkumar beobachteten einen Anstieg der sSMPD1 im Serum von Tumorpatienten nach einer Tumorbestrahlung mit 15 Gy (n=11) (Sathishkumar et al. 2005). Ein Anstieg der sSMPD1 Aktivität wurde von einer Zunahme des Ceramidgehalts der LDL im Blut begleitet, deren apoptogenes Potential

dadurch ebenfalls zunahm. Schließlich maßen Takahashi et. al. erhöhte sSMPD1 Aktivitäten bei Kindern mit hämophagozytische Lymphohistozytose und begleitender Hyperzytokinämie (n=3) (Takahashi et al. 2002). Dies ist der bisher einzige Anhalt, der eine veränderte sSMPD1 Aktivität im Blut im Rahmen einer systemischen Immunreaktion beim Menschen direkt nachweisen konnte.

### 1.11. Sphingolipide und Inflammation

Ungeachtet einer möglichen Rolle der sSMPD1 gibt es eine Vielzahl von Belegen für eine Einbindung des Sphingomyelinstoffwechsels in die zelluläre Stressantwort und die Regulation von Inflamationsprozessen (Mathias et al. 1998, Pettus et al. 2004). Entsprechend ihrer bereits erwähnten Bedeutung für den Zellstoffwechsel sind Sphingolipide und speziell die Metabolite des Sphingomyelins an der Steuerung von Differenzierung und Apoptose immunkompetenter Zellen beteiligt (Baumruker und Prieschl 2002). Des Weiteren nehmen sie Einfluss auf die Signalprozesse der am Entzündungsgeschehen beteiligten Zellformen wie beispielweise den Endothelzellen.

Mittlerweile mehren sich die Hinweise auf eine Beteiligung des Sphingomyelinstoffwechsels in der Pathogenese der systemischen Inflamationsreaktion und speziell der Sepsis. Delogu et al. konnten für ihre Studienpopulation zeigen, dass zirkulierende mononukleare Zellen bei septischen Patienten erhöhte Konzentrationen zellgebundenen Ceramids aufweisen (Delogu et al. 1999). Dabei waren die gemessenen Konzentrationen bei Patienten, die ein *multiple organ failure syndrome* (MODS) entwickelten, am höchsten. Auch Drobnik et al. konnten eine erhöhte Konzentration von Ceramid im Blut von septischen Patienten nachweisen, wobei auch hier hohe Konzentration mit einem ungünstigen Ausgang vergesellschaftet waren (Drobnik et al. 2003). Zuvor hatten bereits Lightle et al. im Rahmen eines Versuchs mit freiwilligen Probanden zeigen können, dass die intravenöse Gabe von Endotoxin neben der Symptomatik einer systemischen Inflamationsreaktion einen Anstieg der Ceramidplasmakonzentration auslösen kann (Lightle et al. 2003).

Auch wenn die genaue Bedeutung dieser Veränderungen im Sphingomyelinstoffwechsel für die Inflamationsreaktion bisher ungeklärt bleibt, wird vor dem Hintergrund des apoptogenen Potentials von Ceramid über eine mögliche Beteiligung bei der Entwicklung von Immunsuppression und Organdysfunktion spekuliert (Pettus et al 2002, Delogu et al. 1999, Lightle et al. 2003). In beiden Fällen stellt Apoptose erwiesenermaßen einen entscheidenden pathogenetischen Faktor dar (Hotchkiss und Karl 2003, Papathanassoglou et al. 2000).



Dass die Beeinträchtigung der Organfunktion durch Metabolite des Sphingomyelins zudem über eine Induktion von Apoptose hinausgehen könnte, zeigen die Untersuchungen zu den Mechanismen der kardiodepressiven Wirkung von TNF- $\alpha$  und Endotoxin. Werden kardiale Myozyten mit TNF- $\alpha$  stimuliert, lässt sich eine Aktivierung sowohl der neutralen als auch der sauren Sphingomyelinase beobachten (Oral et al. 1997). In einem nächsten Schritt wird das so entstandene Ceramid zu Sphingosin metabolisiert, welches dann seine negativ inotrope Wirkung am Herzmuskel entfalten kann. Am Mausmodel konnte bereits bestätigt werden, dass eine Hemmung des Ceramidabbaus zu Sphingosin die kardiodepressive Wirkung von Endotoxin verhindern kann (Favory et al. 2004). Die Aktivierung des Sphingomyelinstoffwechsel könnte somit ein wesentlicher Pathomechanismus in der Entstehung der septischen Kardiomyopathie sein.

Inwieweit es im Zusammenhang mit der chronischen Herzinsuffizienz zu einer Aktivierung des Sphingomyelinstoffwechsels kommt wurde bisher nicht untersucht. Die Aktivierung einer systemischen Inflammationsreaktion lässt aber auch hier Veränderungen im Sphingolipidstoffwechsel insbesondere der sSMPD1 Aktivität vermuten.

## 2. Zielsetzung

Verschiedene *in vitro* Versuche wie auch Untersuchungen am Tiermodell haben gezeigt, dass inflammatorische Prozesse mit vielfältigen Veränderungen auf der Ebene des Sphingomyelinstoffwechsels einhergehen. Gleichzeitig greifen Metabolite des Sphingomyelins regulativ in Immunfunktionen ein. Erste Beobachtungen am Menschen konnten zeigen, dass sich generalisierte Entzündungsprozesse auch in systemischen Veränderungen des Sphingomyelinstoffwechsels niederschlagen. Eine Aktivierung dieses Stoffwechselweges wurde dabei durch Bestimmung verschiedener Parametern des Sphingomyelinstoffwechsels im Blutplasma beobachtbar. Mit einer Ausnahme existierten bisher keine wissenschaftlichen Arbeiten, die einen direkten Nachweis über Aktivitätsveränderungen der sezernierten Sphingomyelinase, sSMPD1, im Blut von Patienten mit systemischer Inflammation geführt haben. Sphingomyelinasen nehmen eine Schlüsselposition in der Aktivierung des Sphingomyelinstoffwechsels ein. Die sezernierte Sphingomyelinase hat möglicherweise entscheidende Bedeutung bei einer systemischen Aktivierung des Sphingomyelinstoffwechsels.

**Vor diesem Hintergrund haben wir folgende Arbeitshypothesen aufgestellt:**

- (1) Akute und chronische systemische Inflammationszustände gehen mit einer erhöhten sSMPD1 Aktivität einher.
- (2) Die Schwere der systemischen Inflammationsreaktion spiegelt sich im Ausmaß des sSMPD1 Anstieges wider.
- (3) Die kürzlich für das rekombinante Enzym beschriebene Aktivitätssteigerung unter oxidativen Bedingungen spielt auch für das native Enzym im Blut eine Rolle und stellt neben der sSMPD1 Sekretion einen weiteren Mechanismus für eine Zunahme der sSMPD1 Aktivität im Rahmen von systemischen Inflammationsreaktionen dar.

Zur Überprüfung der Hypothesen (1) und (2) wurden drei unterschiedliche Patientenstudien durchgeführt. Zur Beurteilung von Veränderungen der sSMPD1 Aktivität im Rahmen von akuten systemischen Inflammationsreaktionen wurden sowohl Patienten mit schwerer Sepsis und septischen Schock als auch Patienten mit elektivem herzchirurgischen Eingriff bei unterschiedlicher operativer Invasivität in die Untersuchungen einbezogen. Als Patientengruppe mit chronischem systemischen Inflammationszustand dienten Patienten mit chronischer Herzinsuffizienz, die mindestens seit 6 Monaten bestand. Da die Auswirkungen von systemischen Veränderungen auf der Ebene des Sphingomyelinstoffwechsels bisher ungeklärt sind, wurde in dieser Patientengruppe gleichzeitig versucht, einen Zusammenhang zwischen sSMPD1 Aktivität und verschiedenen Funktionsparametern wie Gefäßreagibilität, Konstitution, Muskelfunktion und Belastbarkeit herzinsuffizienter Patienten herzustellen.

### **3. Material und Methoden**

#### **3.1. Verwendete Materialien**

Natriumacetatlösung p.a., MERCK, Darmstadt

Zinksulfat, Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München

Nonidet (NP) 40 Puffer, Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München

NDB C<sub>6</sub>-Sphingomyelin, Invitrogen GmbH, Karlsruhe

Chloroform p.a., Carl Roth GmbH +Co KG, Karlsruhe

Methanol p.a., Carl Roth GmbH +Co KG, Karlsruhe

Ammoniak, Fluka Chemie GmbH, Buchs, Schweiz

DC Alufolien 20x20cm Kieselgel 60 F<sub>254</sub>, MERCK, Darmstadt

human sTNF RI , Quantikine<sup>®</sup> , R&D Systems, Minneapolis, MN, USA

#### **3.2. Verwendete Geräte und Software**

Vortex Genie 2 <sup>TM</sup>, Scientific industries, Bohemia, N.Y., USA

Wasserbad, GFL mbH, Burgwedel

Centrifuge 5810 R, Eppendorf, Hamburg

SPD 111 SpeedVac, Thermo savant, Holbrook, N.Y., USA

DC-Kammern

Futjifilm FLA 5000, Fuji-Raytest GmbH, Berlin

Aidasoftware Version 3.52.046

Microsoft Excel 2003

SPSS 12.0

### 3.3. Laborchemische Verfahren:

Im Rahmen der im Weiteren beschriebenen Patientenstudien und anderer Untersuchungen kamen folgende laborchemische Verfahren zum Einsatz:

#### 3.3.1. Bestimmung der sphingolytischen Aktivität im Blutplasma/-serum:

Die Bestimmung der enzymatischen sSMPD1 Aktivität im Blutplasma/-serum erfolgte mit Hilfe eines fluorimetrischen Verfahrens. Grundlage dieses Verfahrens ist die Verwendung eines mit einem Fluorophor markierten C<sub>6</sub>-Sphingomyelins als Substrat für die enzymatische Reaktion. Das fluoreszierende Sphingomyelin trägt dabei als Fettsäurerest am Stickstoffatom des Sphingosins einen NBD-Fluorophor (Abb. 2).

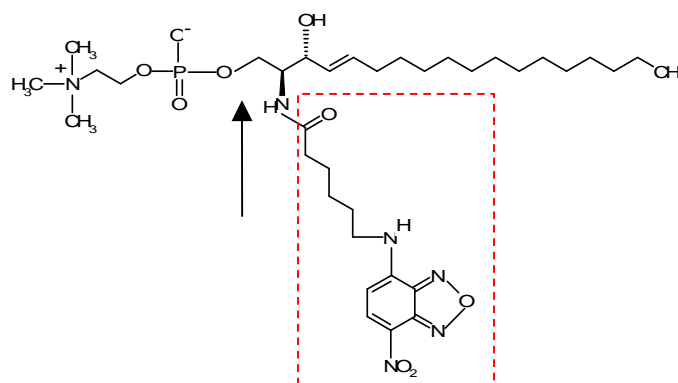


Abb. 2: Strukturformel des eingesetzten Substratanalogons: N-([7-Nitrobenz-2-oxa-1,3-diazol-4-yl]-aminohexanoyl)-sphingosylphosphocholin = NBD-C<sub>6</sub>-Sphingomyelin. Der Fluorophor-Anteil ist rot eingerahmt. Der Pfeil kennzeichnet den Angriffspunkt der Sphingomyelinasen

Im Rahmen der enzymatischen Reaktion wird der hydrophile Phosphocholinrest vom Sphingomyelinmolekül abgespalten. Das entstandene Ceramid, welches weiterhin den NBD-Fluorophor trägt, lässt sich dann aufgrund seiner Hydrophobizität mit Hilfe einer Dünnschicht-Chromatographie vom Sphingomyelin separieren. Anschließend wird die umgesetzte Ceramidmenge basierend auf ihrem Fluoreszenzsignal densitometrisch ausgewertet und anhand einer Kalibrierungsgeraden die enzymatische Aktivität quantifiziert.

Voraussetzung für die Aktivitätsbestimmung eines jeden Enzyms sind optimale Reaktionsbedingungen. Im Falle der Bestimmung der sSMPD1 Aktivität werden deshalb während der Inkubation von Substrat und Enzym folgende Bedingungen eingehalten: ausreichende Substratsättigung, ausreichende Verfügbarkeit des Cofaktors Zink, ein saures

Milieu mit einem pH Wert von 5,0 sowie eine Reaktionstemperatur von 37°C entsprechend der Körpertemperatur.

Im Einzelnen erfolgte die sSMPD1 Aktivitätsbestimmung im Blutplasma/-serum wie folgt:

**Inkubation** Die bei -80°C gelagerten Blutplasma/-serumproben wurden auf Eis langsam aufgetaut. Zu 150µl Inkubationspuffer (pH 5,0) bestehend aus 124µl 100mM Natriumacetat, 16µl 0,1% NP-Puffer/100mM Natriumacetat und 10µl 2mM Zinksulfat/100mM Natriumacetat wurden 10µl Blutplasma/-serum hinzugegeben. Anschließend erfolgte unter weitestgehendem Lichtausschluss die Hinzugabe von 40µl fluoreszierendem NBD-Sphingomyelin/0,1% NP-Puffer/100mM Natriumacetat entsprechend einer Menge von 1 nmol NBD Sphingomyelin. Der finale Inkubationsansatz mit einem Volumen von 200µl entsprach damit bis auf einige methodenspezifische Modifikationen der in der Literatur (Schissel 1996b, Wong 2000) beschriebenen Zusammensetzung für radioaktive Bestimmungsmethoden. Der Reaktionsansatz wurde dann für zwei Stunden im 37°C warmen Wasserbad inkubiert. Im Anschluss an die Inkubation wurde der Reaktionsansatz direkt bei -80°C eingelagert, um die enzymatische Reaktion zu stoppen.

**Extraktion** Nach erneutem Auftauen auf Eis erfolgte die Lipidextraktion entsprechend der Methode von Bligh und Dyer (Bligh und Dyer 1959) mit folgenden Modifikationen: Der komplette Reaktionsansatz wurde einem Gemisch bestehend aus 500µl Chloroform und 250µl Methanol beigesetzt. Dieser Extraktionsansatz wurde dann zur vollständigen Durchmischung für eine Minute bei Maximum gevortext. Anschließend erfolgte zur Phasentrennung die Zentrifugation bei 1000xg und 4°C. Die untere Chloroform-/Methanolphase wurde daraufhin in ein neues Eppendorfröhrchen überführt und der Extraktionsschritt durch erneute Hinzugabe von 300µl Chloroform zum Extraktionsansatz wiederholt.

Das so gewonnene Chloroform-/Methanolextrakt enthält als lipophile Phase die verschiedenen im Blutplasma/-serum enthaltenen Phospho- und Sphingolipide einschließlich des verwendeten fluoreszierenden Sphingomyelins und des generierten Spaltprodukts Ceramid. Mit Hilfe einer Vakuumzentrifuge (SPD-SpeedVac Thermosavant) erfolgte dann die Vakuumevaporisation des Chloroformextrakts. Das gewonnene Lipidpellet wurde bis zur weiteren Verarbeitung bei -80°C zwischengelagert.

**Dünnschichtchromatographie (DC) und Auswertung** Für die dünnschichtchromatographische Auftrennung des Lipidextrakt wurden Kieselgelplatten verwendet. Als Laufmittel diente ein Gemisch aus 65ml Chloroform, 25ml Methanol und 4ml 2M Ammoniak (aq) (Dobrowsky und Gazula 2000). Das Probenmaterial in Form des Lipidpellets wurde in 5µl resuspendiert und auf die Kieselgelplatten aufgetragen. Nach kurzem Trocknen bei Raumluft wurden die bestückten Kieselgelplatten in den mit Laufmittel aufgesättigten DC-Kammern über  $9 \pm 0,5\text{cm}$  entwickelt (Abb. 3).

Im Anschluss an die dünnschicht-chromatographische Auftrennung erfolgte das Auslesen mit einem Fluoreszenzplattenleser (Fuji FLA 5000). Dabei wurden folgende Leseparameter eingestellt: Verstärkung 300V, Auflösung 100µm, Filter LPB, Wellenlänge 473nm.

Die densitometrische Auswertung erfolgte mit Hilfe der Aidasoftware Version 3.52.046 in einer 2D Evaluation. Vom für die jeweilige Probe erhaltenen Messintegral wurde die entsprechende Plasma-/serumleerprobe (Blutplasma/-serum ohne Sphingomyelinsubstrat) und der Ceramidgehalt im Ausgangssubstrat als Hintergrund subtrahiert.

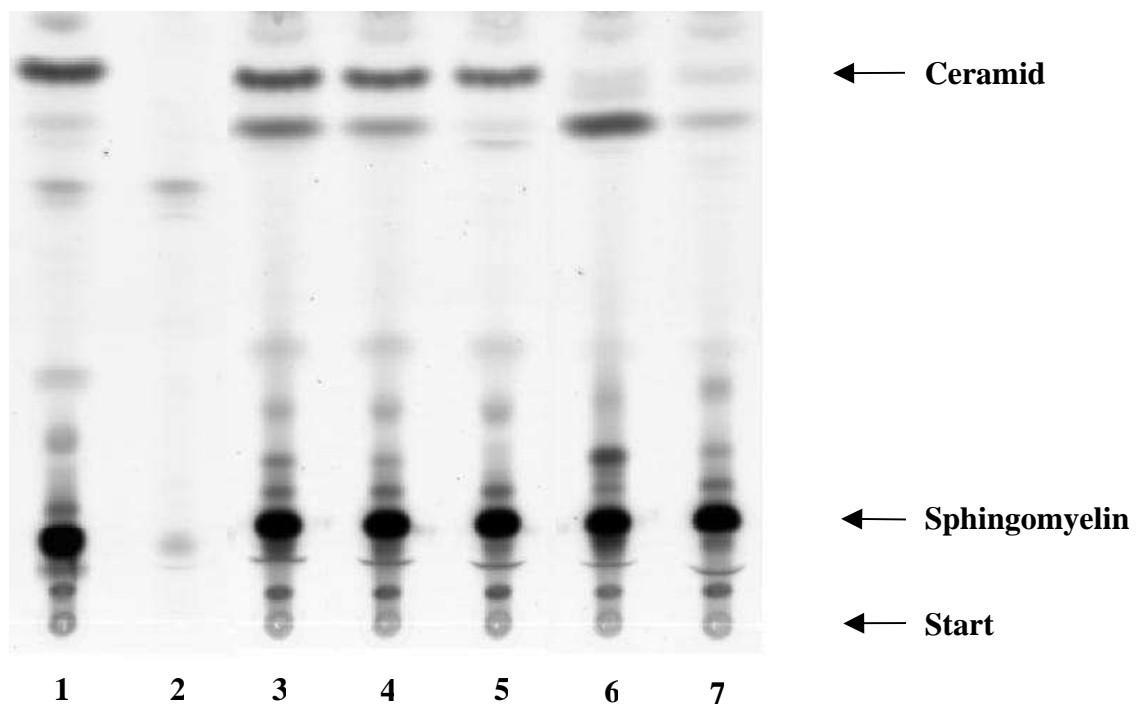


Abb. 3: Dünnschichtchromatographische Auftrennung verschiedener Inkubationsansätze: **1.** Plasmaprobe eines Sepsispatienten + NBD-Sphingomyelin, **2.** Plasmaprobe eines Sepsispatienten ohne NBD-Sphingomyelin, **3.** Plasmaprobe eines gesunden Probanden + NBD-Sphingomyelin + AAPH, **4.** Plasmaprobe eines gesunden Probanden + NBD-Sphingomyelin + AAPH + Asc, **5.** Plasmaprobe eines gesunden Probanden + NBD-Sphingomyelin, **6.** NBD-Sphingomyelin + AAPH, **7.** NBD-Sphingomyelin

Zur Umrechnung der so erhaltenen Messwerte in Absolutmengen an gebildetem Ceramid diente eine Standardreihe aus unterschiedlich konzentrierten NBD-Sphingomyelin-methanollösungen, die auf eine Kieselgelplatte aufgetragen wurde (Abb. 4).

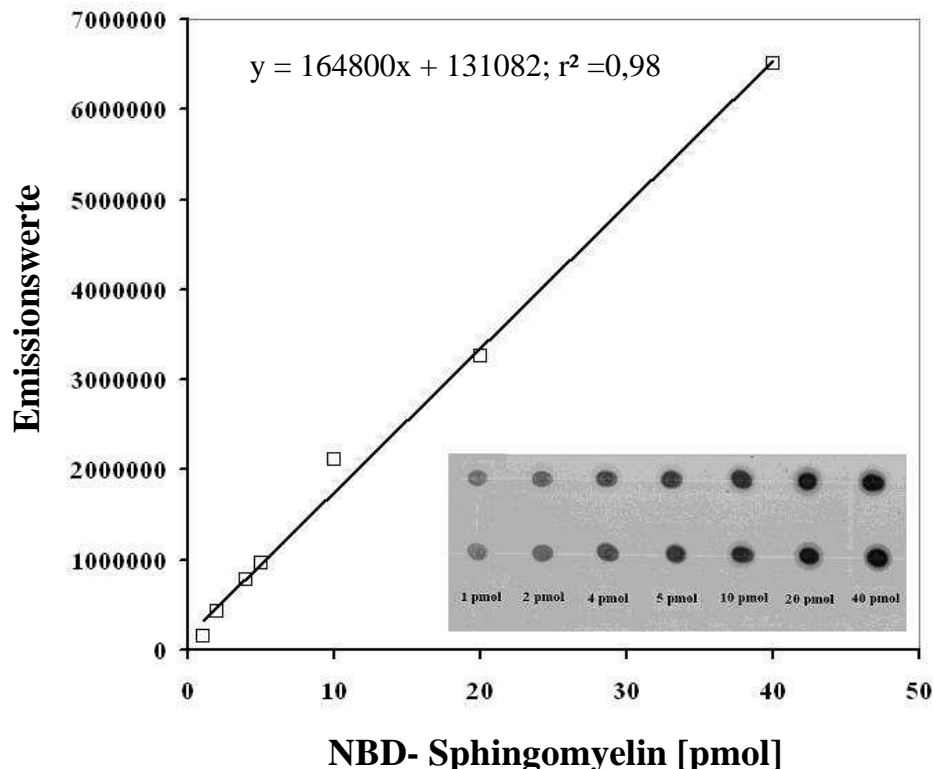


Abb. 4: Standardkurve

Die anhand der Standardkurve errechneten Ceramidmengen bildeten dann die Grundlage für die Bestimmung der enzymatischen Aktivität unter Berücksichtigung der verwendeten Plasma/-serummenge und der Inkubationszeit von zwei Stunden. Der Intraassay-Koeffizient dieses fluorimetrischen Verfahrens zur Bestimmung der sSMPD1 Aktivität lag bei <6%, der Interassay-Koeffizient bei <13%. Beide Koeffizienten wurden durch Mehrfachbestimmung von jeweils 50 Probanden- bzw. Patientenproben erhoben.

### 3.3.2. Bestimmung der sTNF- $\alpha$ RI Konzentration

Die Bestimmung der sTNF- $\alpha$  RI Konzentration bei Patienten mit chronischer Herzinsuffizienz und in der Kontrollgruppe erfolgte mit Hilfe des *Quantikine* ELISAKits von R&D Systems. Zur Kalibrierung diente der mitgelieferte Standard. Alle Proben wurden wie vorgeschrieben 1:10 verdünnt und zweifach bestimmt. In der Folge diente der Mittelwert der Doppelbestimmung für die weitere statistische Auswertung.

### 3.4. Patientenstudien:

Zur Beurteilung der sSMPD1 Aktivität bei akuten und chronischen systemischen Inflammationszuständen wurden drei Patientenstudien durchgeführt.

Die Untersuchung der sSMPD1 Aktivität unter akuten systemischen Inflammationszuständen erfolgte zum einen an Patienten mit elektivem, herzchirurgischen Eingriff und zum anderen an Patienten mit der Diagnose schwere Sepsis oder septischer Schock. Die Diagnosen SIRS, schwere Sepsis und septischer Schock wurden gemäß der in Tabelle 1 (Anhang) aufgeführten Kriterien in Zusammenarbeit mit den in der Einrichtung tätigen Studienärzten und -schwestern gestellt. Zur objektiven Erfassung der Krankheitsschwere und der Beurteilung des klinischen Verlaufs dienten der APACHE II Score und der SOFA Score:

**APACHE II Score:** Dieses Score System wurde zur Beurteilung des individuellen Risikos eines Patienten entwickelt. Es dient als Prognoseparameter und wird einmalig innerhalb der ersten 24 Stunden nach Aufnahme auf die ITS berechnet (Knaus et al. 1985). Der „Acute Physiology and Chronic Health Evaluation“ (APACHE) II Score setzt sich aus drei Komponenten zusammen:

- (1) 12 physiologisch-biochemische Parameter (Temperatur, mittlerer arterieller Blutdruck, Herz- und Atemfrequenz, Oxygenierung, arterieller pH-Wert, Serumkonzentration von Natrium, Kalium und Kreatinin, Leukozytenzahl, Hämatokrit und Glasgow Koma Scale),
- (2) Lebensalter und
- (3) chronische Vorerkrankungen.

**SOFA Score:** Zur Beurteilung der Schwere des *multiple organ failure syndrome* (MODS) wurde der „Sequential Organ Failure Assessment“ (SOFA) Score angewandt. Dieser setzt sich aus einem Kreislauf- (mittlerer arterieller Blutdruck bzw. Katecholaminapplikation), Beatmungs- ( $PO_2/FiO_2$ ), Gerinnungs- (Thrombozytenzahl), Leber- (Bilirubin), Nieren- (Urinausscheidung oder Kreatinin im Serum) und ZNS-Subscore (Glasgow Koma Scale) zusammen (Vincent et al. 1996). Eine Gesamtpunktzahl wurde für jeden Beobachtungstag der Patienten berechnet (maximal erreichbare Punktzahl 24).

Zur Beurteilung der sSMPD1 Aktivität im Rahmen eines chronischen Inflammationsgeschehens dienten Blutproben von Patienten mit chronischer Herzinsuffizienz.



Als Kontrollgruppe für die Patienten mit schwerer Sepsis und septischen Schock sowie für die Patienten mit chronischer Herzinsuffizienz diente eine Gruppe von 13 männlichen, gesunden Freiwilligen mit gleicher Altersverteilung. (Altersmedian: 61.0 Jahre, IQR 25.8; Mittelwert  $\pm$  Standardfehler (SE):  $54 \pm 4$ ).

### 3.4.1. Patienten mit elektivem, herzchirurgischen Eingriff

Eine erste prospektive Longitudinalstudie an 23 herzchirurgischen Patienten erfolgte in Zusammenarbeit mit der Klinik für Herz-, Thorax- und Gefäßchirurgie der Universitätsklinik Jena nach Zustimmung der Ethikkommission und schriftlicher Einverständniserklärung zur Teilnahme an der Studie. Bei allen Patienten wurde im Rahmen eines Elektiveingriffs ausschließlich eine koronare Bypassoperation durchgeführt. 11 Patienten wurden entsprechend eines konventionellen Verfahrens nach Sternotomie und unter Einsatz der Herzlungenmaschine (HLM) operiert. Eine Kardioplegie wurde durch antegrade Verabreichung einer Buckberg Blutkardioplegielösung erreicht. Bei den übrigen 12 Patienten kam das sogenannte *minimally invasive direct coronary artery bypass* (MIDCAB) Verfahren zur Anwendung. Unter Verzicht auf eine Sternotomie und ohne Einsatz der HLM erfolgt bei diesem minimalinvasiven Verfahren die Bypassanlage über ein thorakales Fenster am schlagenden Herzen.

In der HLM Gruppe wurden zwischen 2 und 5 Koronararterienbypässe angelegt, in der MIDCAB Gruppe jeweils lediglich ein Bypass. Die Operation wurde in beiden Gruppen in einer Kombinationsnarkose aus Sulfentanil und Sevofluran durchgeführt. Heparin wurde verabreicht um die activated partial thromboplastin time (aPTT) in der HLM Gruppe über 400 sec, in der MIDCAB Gruppe über 250 sec zu halten.

**Probenentnahme** Um zu beurteilen, wie sich der operative Eingriff an sich und die unterschiedliche Invasivität der beiden chirurgischen Verfahren auf die sSMPD1 Aktivität auswirkte, wurde allen Patienten zu drei Zeitpunkten Blut entnommen. Die erste Blutentnahme erfolgte unmittelbar präoperativ nach Einleitung der Narkose, die zweite zur chirurgischen Hautnaht und die dritte 20 Stunden nach dem operativen Eingriff bzw. bei frühzeitiger Verlegung von der ITS zum Verlegungszeitpunkt. Die Blutentnahmen wurden von den Studienschwestern vorgenommen.

Während des Aufenthaltes auf der Intensivstation wurden die Vitalparameter kontinuierlich in

der elektronischen Patientenakte aufgezeichnet. Zur Einschätzung des Inflammationsstatus wurden die Patienten hinsichtlich vorhandener SIRS-Kriterien beurteilt, außerdem wurde der APACHE II Score am Operationstag (postoperativ) sowie die SOFA Scores am Operationstag (postoperativ) und am Folgetag berechnet. Der Berechnung dieser klinischen “scores“ wurden dabei die jeweils schlechtesten Werte der betrachteten klinischen Parameter in folgenden zwei Zeiträumen zugrundegelegt: 1. Zeitraum von der Aufnahme auf die ITS bis 6:00 Uhr des ersten postoperativen Tages; 2. Zeitraum von 6:00 Uhr des ersten postoperativen Tages bis zur Verlegung auf Normalstation bzw. 6:00 Uhr des zweiten postoperativen Tages.

Die sSMPD1 Aktivität wurde in jeder Patientenprobe zweifach bestimmt. Die statistische Auswertung erfolgte auf Basis des jeweiligen Mittelwertes.

***Multiplex Protein Analyse*** Zur Protein Analyse wurde der Multiplex Bead kit von BioRad Laboratories, Inc. verwendet. Dieser enthielt u.a. mit spezifischen Antikörpern beladene Farbpartikel zur Bestimmung der Zytokine IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$  sowie IL-1 $\beta$ . Für jedes Protein wurden Standardkurven mit einer Variationsbreite von 2 bis 8000 pg/mL erstellt. Die unverdünnten Serumproben (50 $\mu$ l) wurden bei Raumtemperatur eine Stunde mit 50 $\mu$ L der Antikörper-gekoppelten Farbpartikel (5000 Mikrosphären/Protein und *well*) inkubiert. Frisch verdünnte sekundäre Detektions-Antikörper (25 $\mu$ l, 1 $\mu$ g/mL) wurden hinzugefügt und eine Stunde bei Raumtemperatur ruhen gelassen. Daraufhin wurde Streptavidin-gekoppeltes Phycoerythrin (50 $\mu$ l) beigelegt und 10 min bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend erfolgte die Visualisierung durch Zugabe von 125 $\mu$ L Puffer und Ausmessung mit Hilfe des Bioplex Protein Array Systems von BioRad Laboratories, Inc. nach den Angaben des Herstellers. Proteinkonzentrationen sind in pg/mL angegeben. Dieser Teil der Untersuchungen wurde in Zusammenarbeit mit Prof. J. Thiery, Institut für Laboratoriumsmedizin, Klinische Chemie und Molekulare Diagnostik, Universität Leipzig.

***Statistische Auswertung*** Die statistische Auswertung erfolgte mithilfe der SPSS Software Version 12.0. Alle berechneten Parameter sind als Mittelwert  $\pm$  Standardfehler angegeben. Die Prüfung auf Normalverteilung erfolgte mit dem Shapiro-Wilk Test. Falls erforderlich wurde eine logarithmische Transformation durchgeführt. Beim Vergleich der sSMPD1 Aktivität zwischen der HLM und MIDCAB Gruppe erfolgte die Signifikanzprüfung mittels 2-Stichproben t-test. Die Veränderungen der sSMPD1 Aktivität zu den drei Zeitpunkten wurden mit Hilfe des gepaarte t-test auf Signifikanz überprüft.

Bei der Verlaufsbetrachtung der Zytokinkonzentrationen wurde der nicht-parametrische exakte Wilcoxon Test zur Signifikanzprüfung verwendet. Testergebnisse wurden bei zweiseitiger Testung auf einem Niveau von  $p < 0.05$  als signifikant angesehen.

### **3.4.2. Patienten mit schwerer Sepsis und septischen Schock**

Eine zweite prospektive Longitudinalstudie an 12 Patienten mit schwerer Sepsis oder septischen Schock erfolgte an der Klinik für Anästhesiologie und Intensivmedizin der Universitätsklinik Jena. Der entsprechende Studienplan wurde durch die örtliche Ethikkommission nach eingehender Prüfung gebilligt. Eine schriftliche Einverständniserklärung zur Teilnahme an der Studie wurde, wenn möglich vom Patienten selbst, andernfalls von einem gesetzlichen Vertreter eingeholt. Die Kriterien der ACCP/SCCM Consensus Konferenz (Tab. 1, Anhang) für das Vorliegen einer schweren Sepsis oder eines septischen Schock waren bei allen 12 Patienten erfüllt. Initial wurden alle Patienten mit einem empirischen Antibiotikaregime basierend auf den Empfehlungen des hiesigen Instituts für Mikrobiologie behandelt. Im weiteren Behandlungsverlauf wurde die antibiotische Behandlung gemäß dem Ergebnis des jeweiligen Resistogramms modifiziert. Die erste klinische Evaluierung und Blutentnahme erfolgte innerhalb von sechs Stunden nach Diagnosestellung des septischen Krankheitsbildes. Als Endpunkt der Studie wurde der Todesfall oder die Verlegung auf die Normalstation definiert. Die Patientencharakteristika einschließlich Alter, Geschlecht, die genaue klinische Diagnose sowie der jeweilige Endpunkt sind in Tabelle 3 (Anhang) aufgeführt.

**Probenentnahme** Beginnend mit dem Tag der Diagnosestellung des septischen Krankheitsbildes bis zum definierten Endpunkt, wurden täglich Blutproben über einen zentralen Venenkatheter durch die Studienschwestern entnommen. Die Blutentnahme im Falle der Kontrollgruppe erfolgte mittels peripherer Venenpunktion. Das Blut wurde in Zitratröhrchen aufgenommen, das Plasma wurde innerhalb von 30 Minuten nach Blutentnahme durch Zentrifugation (1000xg, 15min, 4°C) abgetrennt, aliquotiert und bei -80°C bis zur weiteren Verarbeitung gelagert.

Bei einer Liegedauer von <10 Tagen auf der ITS erfolgte die sSMPD1 Aktivitätsbestimmung täglich. In den übrigen Fällen am ersten, an mindestens jedem weiteren fünften Tag und an den letzten fünf Studientagen.

**Patientencharakterisierung** Auf Grundlage der Beobachtungswerte innerhalb der ersten 24 Stunden nach Diagnosestellung der schweren Sepsis bzw. des septischen Schocks wurden der klinische Schweregrad für jeden Patienten anhand des APACHE II Scoresystems evaluiert. Ferner wurde an jedem Studientag der SOFA Score erhoben. Außerdem wurden eine kleines Blutbild erstellt, ferner die Blutwerte für Procalcitonin, C-reaktives Protein, Laktat, Kreatinin, Bilirubin, aPTT u.a. vom Institut für klinische Chemie und Labormedizin anhand von kommerziell verfügbaren Testverfahren ermittelt.

**Ergebnispräsentation und statistische Analyse** Die statistische Auswertung erfolgte mithilfe der SPSS Software Version 12.0. Für die sSMPD1 Aktivität der jeweils untersuchten Gruppe sind Median sowie entsprechende 25% und 75% Stichproben-Quartile angegeben. Zum Vergleich der am Tag der Diagnosestellung erhobenen Aktivitätswerte der Patientengruppe mit denen der gesunden Kontrollgruppe wurde der nicht-parametrische, exakte Mann-Whitney-U-Test verwendet. Die Subgruppen, überlebende Patienten vs. verstorbene Patienten, wurden hinsichtlich der am Tag der Diagnosestellung bestimmten sphingolytischen Aktivität sowie der Aktivitäten am Verlegungs- bzw. Todestag gleichfalls anhand des exakten Mann-Whitney-U-Tests miteinander verglichen. Zusätzlich erfolgte ein Vergleich der Subgruppen bezüglich der absoluten sSMPD1 Aktivitätsänderung über den jeweiligen Beobachtungszeitraum. Testergebnisse wurden bei zweiseitiger Testung auf einem Niveau von  $p < 0.05$  als signifikant angesehen.

Um herauszufinden, ob Veränderungen der sphingolytischen Aktivität mit Veränderungen des SOFA-Scores oder der Procalcitonin-Werte einhergingen, wurden die Werte dieser beiden Parameter an den zwei Tagen mit der im Verlauf gemessenen maximalen und minimalen sSMPD1 Aktivität mithilfe des exakten, gepaarten Wilcoxon-Tests verglichen. Als Ausdruck der Größe des Unterschieds zwischen den an diesen beiden Tagen erhobenen SOFA-Score-Werten bzw. Procalcitonin-Werte sind der Median der Differenzen einschließlich entsprechender 25% und 75% Stichproben-Quartile angegeben. Dabei ist der jeweilige Median als positiv ausgewiesen, falls der klinische Parameter einen höheren Wert am Tag mit maximalen sSMPD1 Aktivität als am Tag mit minimaler sSMPD1 Aktivität hatte.

### 3.4.3. Patienten mit chronischer Herzinsuffizienz

Zur Beurteilung der sSMPD1 Aktivität im Rahmen eines chronischen Inflammationsgeschehens dienten Blutproben von Patienten mit chronischer Herzinsuffizienz (CHF). Eine entsprechende Patientenstudie wurde in Zusammenarbeit mit der Forschungsgruppe für kardiale Kachexie von Prof. S. Anker und Dr. W. Döhner an der Universitätsklinik Charité Berlin/Imperial College London/Royal Brompton Hospital London (Vereinigtes Königreich) durchgeführt. Im Rahmen dieser Kooperation konzentrierten wir uns neben der Bestimmung der sSMPD1 Aktivität auf die Analyse der sTNF- $\alpha$  RI Konzentration als Marker für die chronische Inflammation. Alle weiteren Patientendaten wurden von der Berliner Arbeitsgruppe erhoben und uns für die statistische Auswertung und Interpretation zur Verfügung gestellt.

**Studienpopulation** Untersucht wurden 112 männliche Patienten mit CHF und ischämischer (66%) bzw. nicht-ischämischer (34%) Ätiologie. Die Diagnose CHF wurde gestellt, vorausgesetzt es lagen für mindestens 6 Monate klinische Zeichen eines Herzversagens mit Dyspnoe, symptomlimitierter, körperlicher Belastbarkeit oder peripheren Ödemen vor.

Die Diagnose der kardialen Kachexie wurde definiert als nicht beabsichtigter, nicht-ödematöser (wasserfreier) Gewichtsverlust von 7,5% des Körpergewichts innerhalb von 6 Monaten.

Bei allen Patienten ließen sich anhand eines Angiogramms, einer Myokardszintigraphie oder einer Echokardiographie Zeichen der eingeschränkten linksventrikulären Funktion nachweisen. Alle Patienten erhielten eine an der klinischen Symptomatik ausgerichtete Standardmedikation mit Diuretika, ACE-Hemmer oder AT I Rezeptor Antagonisten,  $\beta$ -Blocker, Digitalis, Aspirin und/oder Warfarin in verschiedener Kombination. Zum Zeitpunkt der Blutentnahme waren die Patienten klinisch stabil, Dekompensationszeichen der Herzinsuffizienz, wie beispielsweise erhöhter Jugularvenenpuls, Aszites oder Hepatomegalie lagen nicht vor. Weibliche Patienten wurden von der Studie ausgeschlossen, um Einflüsse des Geschlechts oder damit verbundener Faktoren wie einer Hormonersatztherapie zu verhindern. Die Daten der CHF Patienten wurden mit einer Kontrollgruppe gesunder Freiwilliger (n=13) und einer zweiten Kontrollgruppe (n=11) mit im Vergleich zum Patientenkollektiv gleicher Altersverteilung und bekannter Hypertonie bei fehlenden Anzeichen einer Herzinsuffizienz oder ischämischen Herzerkrankung in der Anamnese verglichen.

Alle Patienten gaben ihr schriftliches Einverständnis für die Teilnahme an der Studie und die

Studie wurde von der lokalen Ethikkommission des Royal Brompton Hospital London genehmigt.

Die Blutentnahme erfolgte am Morgen nach einer nächtlichen Nahrungskarenz und einer 20minütigen Pause in liegender Position. Alle Proben wurden unmittelbar nach Abnahme weiter verarbeitet und das gewonnene Serum wurde bei  $-80^{\circ}\text{C}$  bis zur weiteren Analyse aufbewahrt.

Die Untersuchungen, zur körperlichen Konstitution mittels DEXA Scan, zur Muskelstärke, zum peripheren Gefäßwiderstand mittels Plethysmographie sowie die spiroergometrischen Messungen wurden von Mitarbeitern des Imperial College, London (UK) durchgeführt. Die hierbei zum Einsatz gekommenen Verfahren sollen hier im Einzelnen kurz erläutert werden.

**Konstitutionsbestimmung** Der *body mass index* (BMI) wurde auf die herkömmliche Art und Weise errechnet: Verhältnis von Körpergewicht [kg] zu Körpergröße zum Quadrat [ $\text{m}^2$ ]. Zur Ermittlung der totalen fettgewebfreien Körpermasse und der Fettgewebsmasse sowie ihrer entsprechenden lokalen Verteilung kam, wie zuvor beschrieben (Doehner et al. 2001a), die duale Röntgenabsorptiometrie (DEXA) unter Einsatz eines Lunar DPX Gerätes (Lunar Corp., Madison, WI, USA) zur Anwendung.

Die Ganzkörpermessung wurde im erweiterten „research modus“ analysiert (Software-Version 3.6z, Lunar Corp., Madison, WI, USA), um so Informationen über die totale Gewebszusammensetzung hinsichtlich fettfreiem und Fettgewebe sowie ihrer regionale Verteilung (auf Körperstamm, Arme und Beine) zu erhalten. Die Präzision der Methode für die totale sowie regionale Bestimmung der Gewebszusammensetzung betrug für das fettgewebfreie Gewebe  $>98\%$  und für das Fettgewebe  $>95\%$ . Das als zentrales Fettgewebe ausgewiesene Gewebe umfasst sowohl das viszerale als auch das subkutane Fettgewebe des Körperstamms. Die Summe der Fettgewebsmasse der Extremitäten wurde als periphere Fettgewebsmasse bezeichnet. Die Verteilung der Fettgewebsmasse wurde als Verhältnis von Körperstamm-/Beinfettgewebsmasse berechnet.

**Spiroergometrie** 100 Patienten wurden mittels Fahrradergometrie einem kardiopulmonalen Belastungstest gemäß eines modifizierten Bruce Protokolls unterzogen. Der Spitzensauerstoffverbrauch (Spitzen  $\text{VO}_2$ ) wurde, wie zuvor beschrieben (Anker et al. 1997b), mittels Respirationsmassenspektroskopie (Amis 2000, Odense, Dänemark) sowie einem

standardmäßigen Gasdilutionsverfahren bestimmt und als Maß für die oxidative Kapazität und individuelle Leistungsfähigkeit gewertet.

**Bestimmung der Muskelkraft** Bei 89 Patienten wurde die maximale isometrische Muskelstärke des *M. quadriceps* ermittelt. Wie zuvor beschrieben (Volterrani et al. 1994), wurden hierfür die frei hängenden Beine an einen Druckwandler (Multitrace 2, Lectromed, Jersey, Channel Islands) angeschlossen. Das beste Resultat von drei willkürlichen Muskelkontraktionen, mit einem Ruheintervall von jeweils einer Minute, wurde als maximale Muskelstärke gewertet. Zusätzlich wurde, wie zuvor beschrieben (Jones et al. 1983), bei 39 dieser Patienten die Querschnittsfläche des *M. quadriceps* mittels ultra-schneller Computertomographie (Imatron, San Francisco, USA) bestimmt. Die absolute bzw. relative Muskelstärke ist in Newton und Newton/Muskelquerschnittsfläche ( $\text{N}/\text{cm}^2$ ), respektive, angegeben.

**Plethysmographie** Mittels venöser Verschlussplethysmographie unter Verwendung einer Druckmanschette wurde bei 46 Patienten der Blutfluss im Unterarm der dominanten Seite bestimmt (entsprechend Doehner et al. 2001b). Der Ruheblutfluss [ $\text{ml}/100\text{ml}/\text{min}$ ] wurde in liegender Position nach einer Ruhephase von wenigstens 15 min ermittelt. Der stimulierte Spitzenblutfluss während einer induzierten, reaktiven Hyperämie wurde unmittelbar nach einer 3minütigen totalen Ischämie (induziert durch eine externe, proximale, suprasystolische Kompression des entsprechenden Armes) erhoben. Der höchste gemessene Blutfluss nach der Deflation der Blutdruckmanschette wurde als postischämischer Spitzenblutfluss aufgezeichnet. Das Verhältnis zwischen Spitzen- und Ruheblutfluss wurde im Weiteren als Maß für die vasodilatatorische Kapazität verwendet.

**Statistische Methode** Alle Ergebnisse sind als Mittelwert  $\pm$  Standardfehler angegeben. Der ungepaarte Student t-Test, die ANOVA-Analyse sowie die Fischer post hoc Analyse wurde als geeignete Verfahren zum Vergleich der Mittelwerte zwischen den Gruppen erachtet. Nicht-normalverteilte Variablen wurden nach logarithmischer Transformation statistisch ausgewertet. Ein Wahrscheinlichkeitsniveau von  $p < 0.05$  wurde als statistisch signifikant angesehen. Um die Beziehung einzelner Variablen untereinander zu analysieren, wurde die univariate Linearregression (*Pearson's regression*) angewandt.

### 3.5. Einfluss von oxidativem Stress auf die sSMPD1 Aktivität

Untersuchungen zum Einfluss von oxidativem Stress auf die sSMPD1 Aktivität erfolgten an Plasmaproben von 12 gesunden Freiwilligen, die aus dem Laborpersonal (Nichtraucher) rekrutiert wurden. Die Blutproben wurden durch periphere Venenpunktion gewonnen. Das Blut wurde in Zitratröhrchen aufgenommen, das Plasma wurde innerhalb von 30 Minuten nach Blutentnahme durch Zentrifugation (1000xg, 15min, 4°C) abgetrennt, aliquotiert und bei -80 °C bis zur weiteren Verarbeitung gelagert.

Um die Auswirkungen oxidativer Modifikation auf die enzymatische Aktivität von sSMPD1 zu untersuchen, wurde die sphingolytische Aktivität im Plasma nach Inkubation mit dem Radikalbildner 2,2-Azobis-(2-Amidinopropan) Dihydrochlorid (AAPH, Sigma, Deisenhofen) analysiert. Hierzu wurden dem Reaktionspuffer zur sSMPD1 Aktivitätsbestimmung 10 µl einer 200 mM AAPH-Lösung beigefügt, was bei einer Gesamtmenge des Inkubationsansatzes von 200 µl einer Konzentration von 10 mM AAPH gleichkam. Um den Effekt von AAPH eindeutig auf den vermehrten oxidativen Stress zurückführen zu können, wurde einem Kontrollansatz zusätzlich 10 µl einer 4 mM Ascorbinsäurelösung beigemischt, entsprechend einer Endkonzentration von 200 µM Ascorbinsäure. Ein direkter Effekt der Ascorbinsäure auf die Enzymaktivität wurde außerdem ausgeschlossen. Die Ansätze wurden bei 37°C über 3 Stunden im Wasserbad inkubiert.

**Statistische Methode** Die Aktivitätswerte der sSMPD1 in den jeweils 12 Plasmaproben sind als Mittelwerte  $\pm$  Standardfehler für folgende vier Ansätze angegeben: (1) Plasma, (2) Plasma +200 µM Ascorbinsäure, (3) Plasma +10mM AAPH, (4) Plasma +10mM AAPH +200µM Ascorbinsäure. Nach logarithmischer Transformation wiesen die Aktivitätswerte für alle vier Ansätze eine Normalverteilung auf (Shapiro-Wilk-Test). Die Aktivitätswerte wurden mittels gepaartem t-Test auf signifikante Unterschiede überprüft. Dabei wurde für  $p < 0.05$  ein Unterschied als signifikant angesehen.



### 3.6. Graphische Darstellung der Ergebnisse

Die graphische Darstellung erfolgte mit Hilfe der Software Origin 7.0 SR0 und Microsoft Office Excel 2003. Dabei wurden die Ergebnisse in Form von Balkendiagrammen, *boxplots* oder *scatterplots* dargestellt.

Für die Boxplots wurde folgende Darstellungsform gewählt:

1. Die Boxplots umfassen den Wertebereich von der ersten Quartile ( $Q_{25\%}$ ) bis zur dritten Quartile ( $Q_{75\%}$ )
2. Die wagerechte Linie innerhalb der Boxplots kennzeichnet den Median
3. Die ausgefüllten Quadrate kennzeichnen den Mittelwert
4. Leere Quadrate kennzeichnen Werteausreißer definiert als:  
$$x_i \text{ ist Ausreißer nach unten wenn } Q_{25\%} - x_i \geq 1,5 * (Q_{75\%} - Q_{25\%}),$$
$$x_i \text{ ist Ausreißer nach oben wenn } x_i - Q_{75\%} \geq 1,5 * (Q_{75\%} - Q_{25\%})$$
5. Die whiskers umfassen den Wertebereich von der 10. bis zur 90. Percentile.

## 4. Ergebnisse

### 4.1. Patientenstudien

#### 4.1.1. Patienten mit elektivem, herzchirurgischen Eingriff

**Patientencharakterisierung** Die wesentlichen demographischen Faktoren der beiden Patientengruppen sowie verschiedene klinische Parameter sind in Tabelle 2 zusammengefasst.

Tab. 2: Vergleich demographischer Faktoren und klinischer Parameter zwischen konventionell oder minimalinvasiv operierten Patienten (**HLM** vs. **MICAB**) mit elektivem, herzchirurgischen Eingriff  
# kennzeichnet signifikante Unterschied der entsprechenden Parameter zwischen beiden Patientengruppen

Verfahren	HLM	MIDCAB		
Zahl der Patienten	11	12		
davon weiblich	2	1		
Alter [Jahre]	62,5±3,0	63,8±2,8		
BMI [kg/m <sup>2</sup> ]	25,6±0,6 <sup>#</sup>	28,0±0,9		
<b>Komorbiditäten (n)</b>				
<i>Hypertonie</i>	10	8		
<i>COPD</i>	0	1		
<i>Diabetes mellitus</i>	5	1		
<i>chronisches Nierenversagen</i>	3	1		
OP-Dauer [min]	227,6±10,4	119,5±6,6		
<b>postoperativ</b>				
postoperativer Hämatokrit	28,0±1,1 <sup>#</sup>	34,9±1,3		
Scores [Punkte]				
APACHE II	12±1,3	9,7±0,9		
	<b>Tag 1</b>	<b>Tag 2</b>	<b>Tag 1</b>	<b>Tag 2</b>
SOFA Score	6,1±0,5 <sup>#</sup>	4,27±0,6	4,6±0,4	3,5±0,5
SOFA Subscores				
<i>Herz-Kreislauf</i>	2,8±0,3	1,1±0,3	1,9±0,3	0,6±0,2
<i>Atmung</i>	1,8±0,2	1,6±0,2	2,3±0,1	1,9±0,2
<i>Niere</i>	0,7±0,4	0,6±0,4	0,2±0,1	0,3±0,1
<i>Gerinnung</i>	0,6±0,2	0,7±0,2	0,1±0,1	0,3±0,1
<i>Leber</i>	0	0,2±0,1	0,2±0,1	0,3±0,2
Patienten mit SIRS (%)	73	45	58	42
Patienten mit Schock (%)	18	0	0	0

Beide Gruppen (HLM vs. MIDCAB) wiesen keinen Unterschied in der Altersverteilung auf ( $62.5 \pm 3.0$  vs.  $63.8 \pm 2.8$ ). Der BMI in der HLM Gruppe war signifikant niedriger als in der MIDCAB Gruppe ( $25.6 \pm 0.6$  kg/m<sup>2</sup> vs.  $28.0 \pm 0.9$  kg/m<sup>2</sup>;  $p < 0.05$ ). Verfahrensbedingt lag die Operationszeit in der HLM Gruppe im Mittel um mehr als 100 min über der der MIDCAB Gruppe. Die Bypasszeit in dieser Gruppe lag im Mittel bei  $105.7 \pm 8.6$  min, die Aortenklammzeit bei  $58.5 \pm 4.2$  min und die Reperfusionzeit betrug  $39.5 \pm 4.8$  min.

Der postoperative Hämatokrit war in der HLM Gruppe mit  $28.0 \pm 1.1$  vs.  $34.9 \pm 1.3$  signifikant niedriger als in der MIDCAB Gruppe ( $p < 0.005$ ), was auf einen größeren Blutverlust bzw. eine stärkere Hämodilution in der HLM Gruppe schließen lässt.

Der am Operationstag erhobene APACHE II Score wies in der HLM Gruppe zwar einen höheren Wert als in der MIDCAB Gruppe auf, dieser Unterschied erwies sich allerdings aufgrund der hohen Streuung als nicht signifikant ( $12.0 \pm 1.3$  vs.  $9.7 \pm 0.9$ ;  $p = 0.093$ ). Dagegen fiel der erste der beiden berechneten SOFA Scores in der HLM Gruppe signifikant höher aus als der in der Vergleichsgruppe ( $6.1 \pm 0.5$  vs.  $4.6 \pm 0.4$ ;  $p = 0.029$ ). Im gleichen Zeitraum erfüllten zudem in der HLM Gruppe 8 Patienten die Kriterien für ein SIRS, 2 Patienten wiesen einen kardiogenen Schock auf (91% der Patienten mit SIRS bzw. Schock). In der MIDCAB Gruppe hingegen lag lediglich bei 7 der 12 Patienten (58%) ein SIRS vor.

Beim Vergleich der für den folgenden Zeitraum berechneten SOFA Score-Werte ließ sich kein weiterer signifikanter Unterschied mehr nachweisen ( $4.3 \pm 0.6$  vs.  $3.5 \pm 0.5$ ;  $p = 0.263$ ). In beiden Gruppen fanden sich jeweils 5 Patienten, bei denen die Diagnose eines SIRS gestellt werden konnte (45% vs. 42%).

**Ergebnisse der Multiplexanalyse** Um das Ausmaß der systemischen Inflamationsreaktion besser beschreiben zu können, wurde bei 19 Patienten (8 MIDCAB Patienten, 11 HLM Patienten) eine Multiplexanalyse durchgeführt. Im Rahmen dieser Analyse wurden die Zytokinkonzentrationen von IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$  und IL-1 $\beta$  erhoben.

In Abhängigkeit vom angewandten chirurgischen Verfahren ergab sich ein unterschiedlicher Konzentrationsverlauf der Zytokine (Abb. 5 und 6). Während sich im Fall der MIDCAB Patienten zunächst keine signifikanten Veränderungen (IFN- $\gamma$ :  $11.33 \pm 5.03$  vs.  $19.54 \pm 7.2$  pg/ml,  $p > 0.2$ ; TNF- $\alpha$ :  $2.77 \pm 0.43$  vs.  $2.69 \pm 0.35$  pg/ml,  $p > 0.8$ ) zeigten, wiesen bei den HLM Patienten die IFN- $\gamma$  und TNF- $\alpha$  Konzentrationen bereits zum Zeitpunkt der ersten postoperativen Blutentnahme einen signifikanten Anstieg auf (IFN- $\gamma$ :  $4.49 \pm 1.70$  vs.  $58.78 \pm 26.46$  pg/ml,  $p < 0.002$ ; TNF- $\alpha$ :  $2.58 \pm 0.34$  vs.  $13.55 \pm 6.19$  pg/ml,  $p < 0.002$ ). Erst zum

Zeitpunkt der zweiten postoperativen Blutentnahme ließ sich auch in der MIDCAB Gruppe ein allerdings wesentlich moderaterer Konzentrationsanstieg der Zytokine IFN- $\gamma$  und TNF- $\alpha$  beobachten (IFN- $\gamma$ :  $36,18 \pm 6,97$  pg/ml,  $p < 0,04$ ; TNF- $\alpha$ :  $5,27 \pm 1,17$  pg/ml,  $p > 0,07$ ). Lediglich der Anstieg von IFN- $\gamma$  wies dabei eine Signifikanz gegenüber dem präoperativen Ausgangswert) auf. Zum gleichen Zeitpunkt tendierten die Konzentrationen von IFN- $\gamma$  und TNF- $\alpha$  in der HLM Gruppe bereits wieder in den Bereich ihrer präoperativen Werten (IFN- $\gamma$ :  $14,95 \pm 3,29$  pg/ml; TNF- $\alpha$ :  $3,55 \pm 0,51$  pg/ml). Einem ähnlichen Verhalten zeigte der Konzentrationsverlauf von IL-1 $\beta$ . Allerdings ergaben sich hier für keine der beiden Gruppen signifikanten Veränderungen.

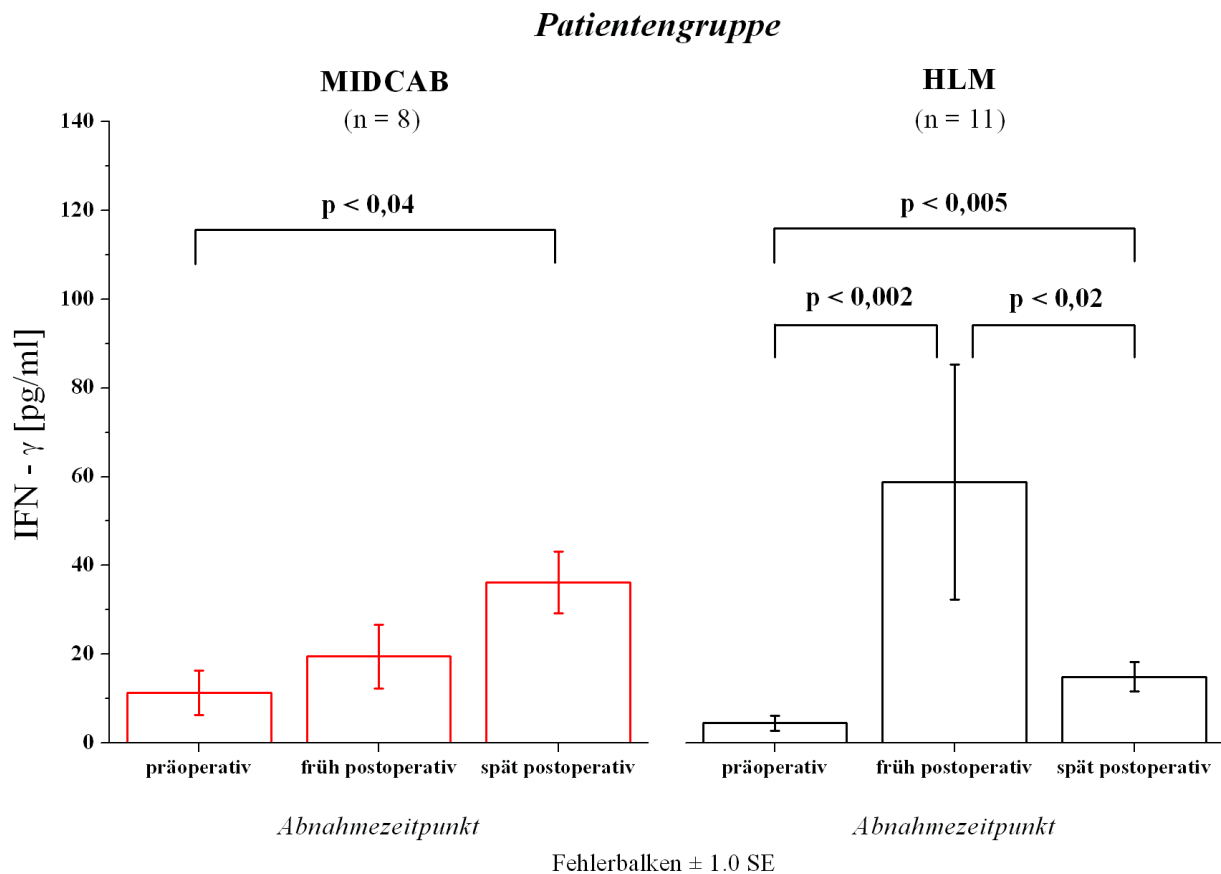


Abb. 5: Gegenüberstellung des IFN- $\gamma$  Konzentrationsverlaufes zu den drei Messzeitpunkten präoperativ, früh postoperativ und spät postoperativ bei minimalinvasiv oder konventionell operierten Patienten (MIDCAB vs. HLM) bei elektivem, herzchirurgischen Eingriff

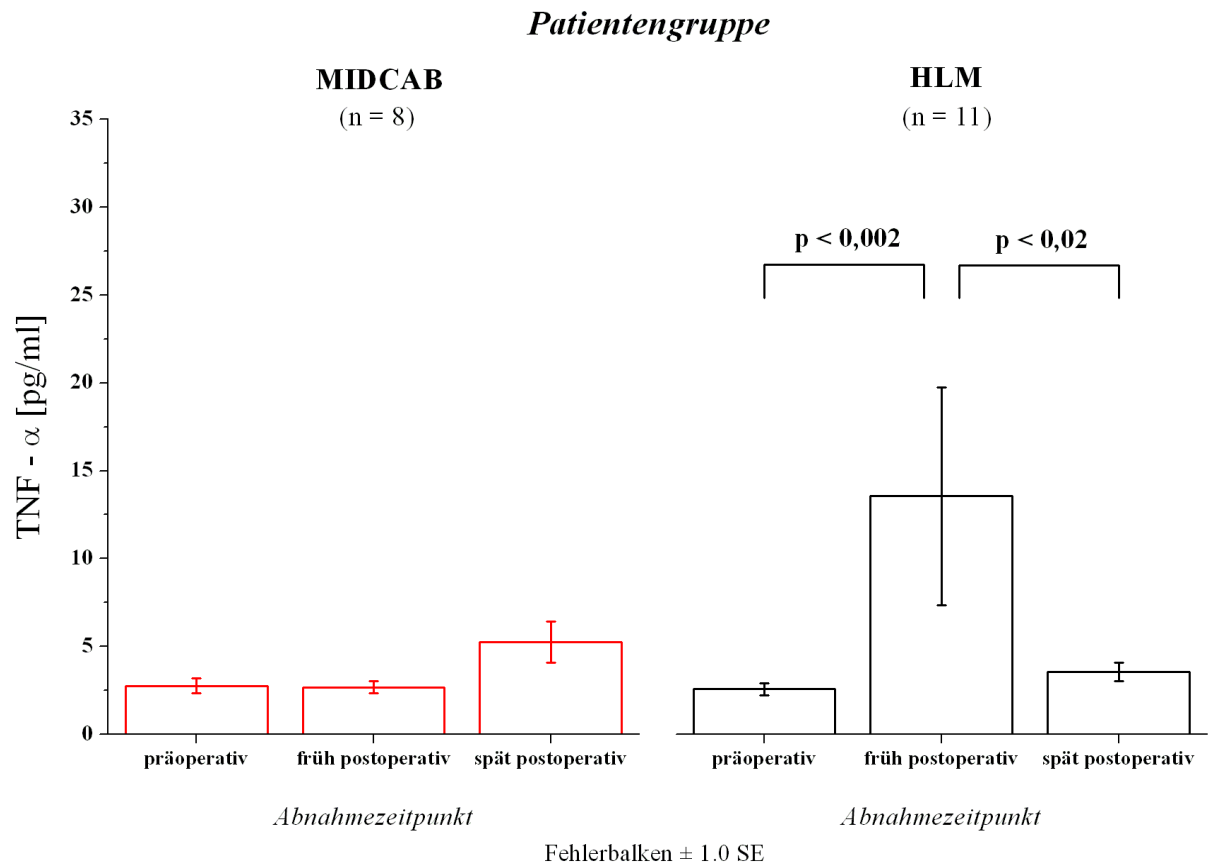


Abb. 6: Gegenüberstellung des TNF- $\alpha$  Konzentrationsverlaufes zu den drei Messzeitpunkten präoperativ, früh postoperativ und spät postoperativ bei minimalinvasiv oder konventionell operierten Patienten (**MICAB** vs. **HLM**) bei elektivem, herzchirurgischen Eingriff

### ***sSMPD1 Aktivität bei Patienten nach herzchirurgischem Eingriff (MIDCAB und HLM)***

Für die präoperativ erhobene sSMPD1 Aktivität ergab sich in der HLM Patientengruppe ein Mittelwert von  $172,3 \pm 23,3$  pmol/(ml\*h). In der MIDCAB Gruppe lag der präoperative Ausgangswert zwar mit  $153,8 \pm 26,9$  pmol/(ml\*h) etwas niedriger, allerdings war dieser Unterschied im Vergleich zur HLM Gruppe nicht signifikant ( $p=0,612$ ).

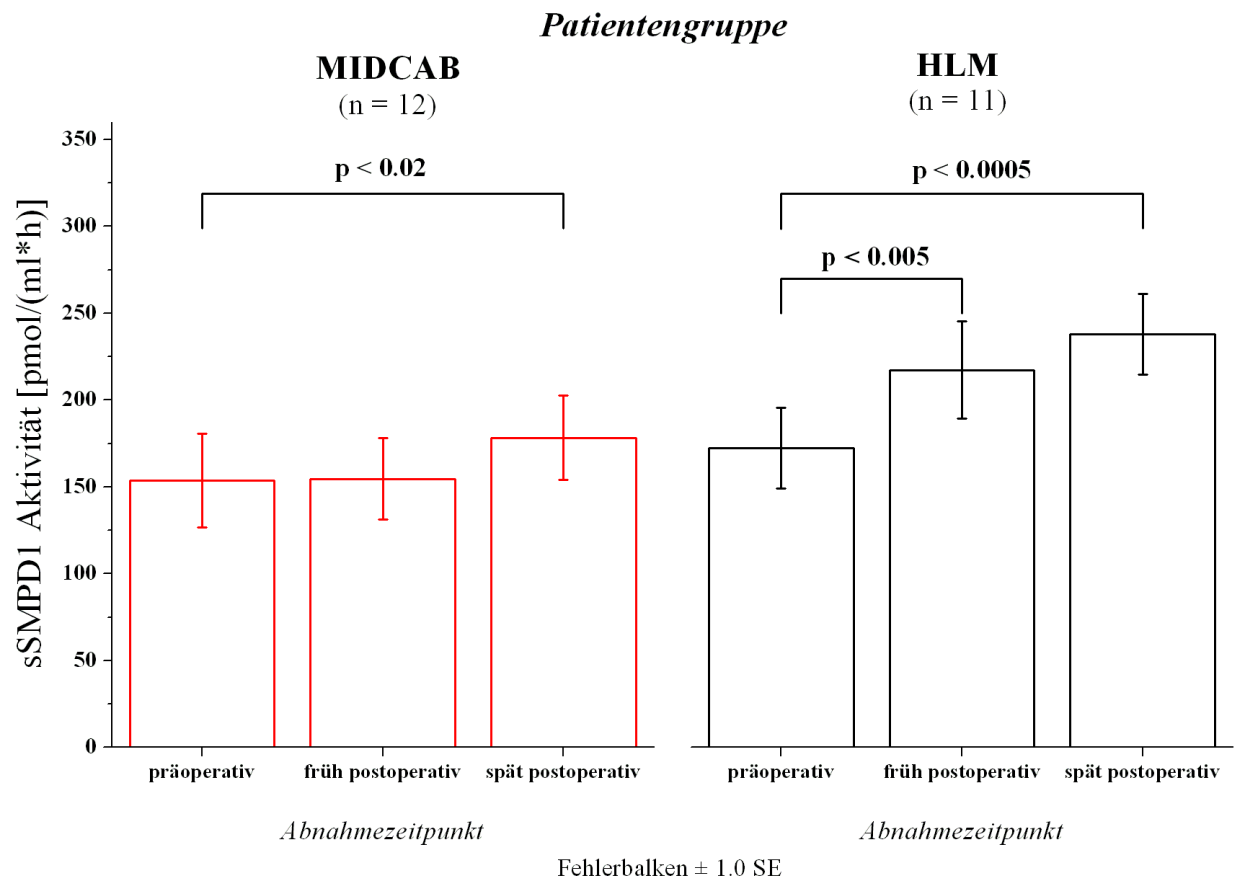


Abb. 7: Gegenüberstellung des sSMPD1 Aktivitätsverlaufes zu den drei Messzeitpunkten präoperativ, früh postoperativ und spät postoperativ bei minimalinvasiv oder konventionell operierten Patienten (**MICAB** vs. **HLM**) bei elektivem, herzchirurgischen Eingriff

In der HLM Gruppe ließ sich in der Folge bereits unmittelbar nach dem chirurgischen Eingriff, zum Zeitpunkt der ersten postoperativen Blutentnahme, ein signifikanter Anstieg der sphingolytischen Aktivität im Plasma um  $45,1 \pm 11,8$  pmol/(ml\*h) auf  $217,3 \pm 27,9$  pmol/(ml\*h) nachweisen ( $p=0,003$ ) (Abb. 7). 20 Stunden nach der Operation stieg der Mittelwert weiter auf  $238,0 \pm 23,2$  pmol/(ml\*h), allerdings erwies sich dieser weitere Anstieg gegenüber dem initialen postoperativen Wert als nicht signifikant ( $p=0,202$ ).

Die MIDCAB Gruppe wies dagegen zum Zeitpunkt der ersten postoperativen Blutentnahme zunächst eine nahezu unveränderte sSMPD1 Aktivität von  $154,6 \pm 23,4$  pmol/(ml\*h) auf. Erst 20 Stunden nach dem weniger invasiven Eingriff ließ sich auch in dieser Patientengruppe ein im Vergleich zum präoperativen Wert signifikanter Anstieg der sphingolytischen Aktivität im Plasma um  $24,6 \pm 9,9$  pmol/(ml\*h) auf  $178,4 \pm 24,1$  pmol/(ml\*h) verzeichnen ( $p=0,031$ ).

Beim direkten Vergleich beider Patientengruppen fiel die absolute sSMPD1 Aktivitätszunahme über den gesamten Beobachtungszeitraum in der HLM Gruppe signifikant stärker aus als in der MIDCAB Gruppe ( $65,7 \pm 12,6$  pmol/(ml\*h) vs.  $24,6 \pm 9,9$  pmol/(ml\*h);  $p < 0,02$ ) (siehe Abb. 8). So stieg bei individueller Verlaufsbetrachtung die sSMPD1 Aktivität in der HLM Gruppe um  $47,4\% \pm 9,6\%$  gegenüber  $30,6\% \pm 10,2\%$  in der MIDCAB Gruppe.

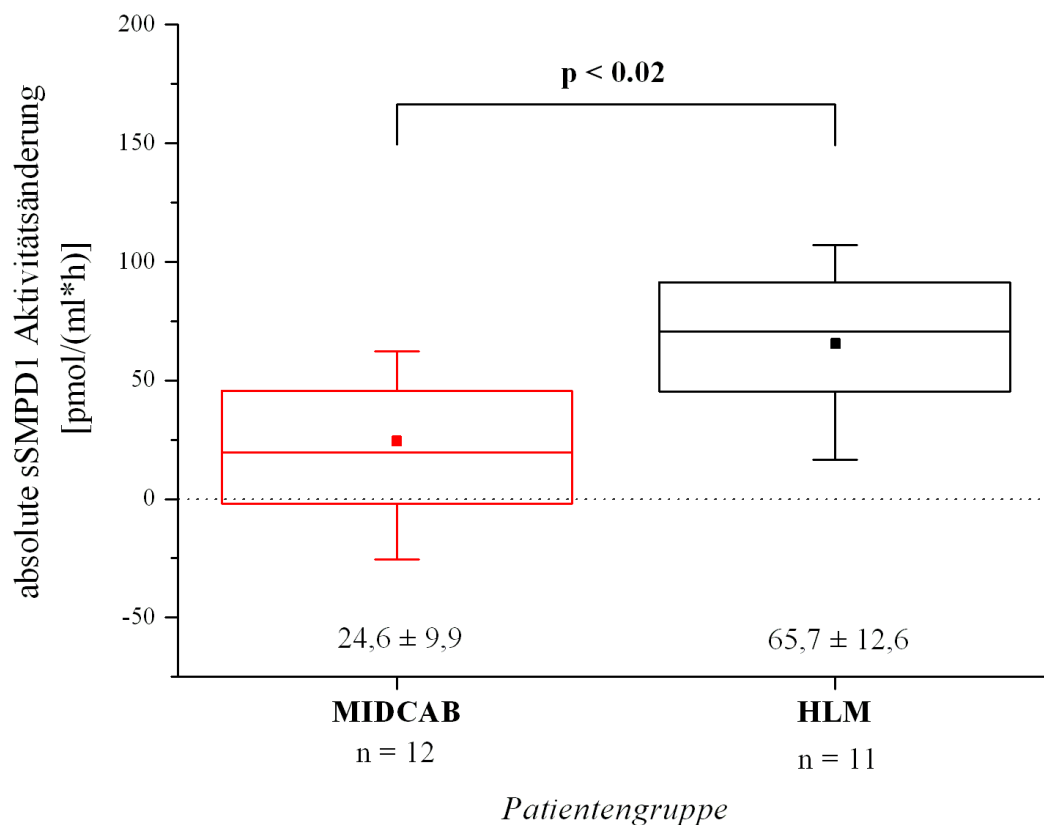


Abb. 8: Vergleich der absoluten sSMPD1 Aktivitätsänderung im Beobachtungszeitraum präoperativ bis spät postoperativ von minimalinvasiv oder konventionell operierten Patienten (MIDCAB vs. HLM) bei elektivem, herzchirurgischen Eingriff. Mittelwert  $\pm$  Standardfehler sind zusätzlich als Zahlenwert in der Abbildung angegeben.

Darüber hinaus wiesen Patienten, die am ersten postoperativen Tag die Kriterien für das Vorliegen eines SIRS weiterhin erfüllten, eine signifikant höhere sSMPD1 Aktivität auf als Patienten ohne Zeichen der systemischen Inflammation (n=10 vs. n=13;  $248,4 \pm 27,4$  pmol/(ml\*h) vs.  $175,0 \pm 19,4$  pmol/(ml\*h);  $p=0,035$ ) (Abb. 9).

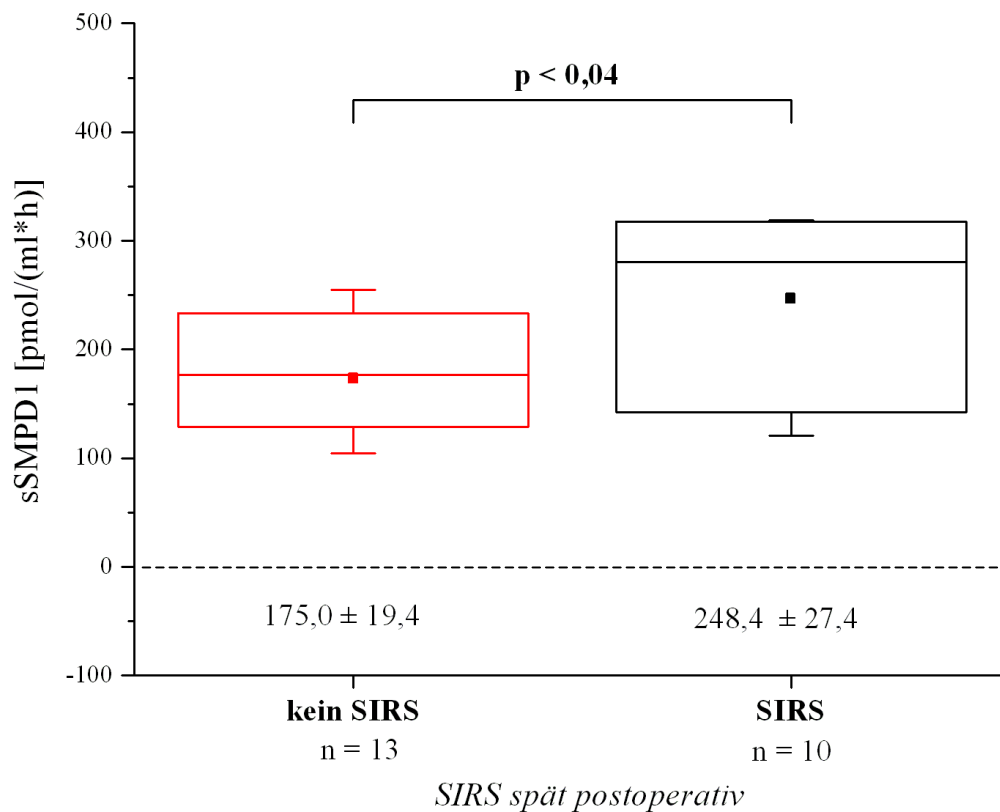


Abb. 9: Vergleich der sSMPD1 Aktivitäten in Abhängigkeit vom Vorliegen eines SIRS zum spät postoperativen Zeitpunkt bei Patienten nach elektivem, herzchirurgischen Eingriff. Mittelwert  $\pm$  Standardfehler sind zusätzlich als Zahlenwert in der Abbildung angegeben.



#### 4.1.2. sSMPD1 Aktivität bei Patienten mit Sepsis oder septischem Schock

**Patientencharakterisierung** Tabelle 3 (Anhang) und Tabelle 4 fassen die wesentliche klinischen Charakteristika und Laborparameter zusammen. In Tabelle 3 (Anhang) sind die allgemeinen demographischen Daten, die Ergebnisse der mikrobiologischen Untersuchung sowie die klinischen Merkmale und der jeweilige Endpunkt des Patienten aufgeführt. Insgesamt waren 7 Todesfälle (Patienten ID 1-7) zu beobachten, 5 Patienten (Patienten ID 8-12) wurden auf die Normalstation verlegt. Beim Vergleich der Subgruppen fand sich weder für die Dauer der intensivmedizinischen Behandlung (Verstorbene: 12d vs. Überlebende: 19d) noch für die kumulative Anzahl der Tage mit schwerer Sepsis bzw. septischen Schock (Verstorbene: 10d vs. Überlebende: 12d) oder den APACHE II Punktwert (Verstorbene: 25 vs. Überlebende: 22) ein statistisch signifikanter Unterschied. Darüber hinaus ergab sich ebenfalls kein Unterschied zwischen Verstorbenen und Überlebenden hinsichtlich der am ersten Studientag erhobenen SOFA-Score-Werte und Laktatwerte (Tab. 4).

Überraschenderweise erwiesen sich die initialen Procalcitonin-Werte in der Gruppe der später Überlebenden als signifikant höher. Zudem war die Gruppe der Verstorbenen signifikant älter als die der Überlebenden (68 vs. 47 Jahre).

Tab. 4: Vergleich klinischer und laborchemischer Parameter der Patienten mit schwerer Sepsis oder septischem Schock am ersten und letzten Studientag in Abhängigkeit vom Überleben. Die Werte sind als Median (Q<sub>25%</sub> ; Q<sub>75%</sub>) angegeben. # kennzeichnet signifikante Unterschiede zwischen Überlebenden und Verstorbenen,  $p < 0,05$ .

		Erster Studientag		Letzter Studientag	
		Überlebende	Verstorbene	Überlebende	Verstorbene
<b>sSMPD1</b>	[pmol/(ml*h)]	264,7 (260; 377)	247,6 (185; 320)	151,7 (125; 261)	441,3 (207; 754)
<b>SOFA</b>	points	13 (11; 14)	12 (10; 13)	4 (3; 5)	15 <sup>#</sup> (11; 19)
<b>Procalcitonin</b>	[ng/ml]	10,0 (8,3; 27,1)	3,9 <sup>#</sup> (0,5; 6,4)	0,5 (0,2; 0,6)	3,8 <sup>#</sup> (2,2; 5,3)
<b>Laktat</b>	[mmol/l]	4,4 (2,4; 4,9)	4,6 (3,1; 5,7)	1,3 (0,8; 1,6)	5,8 <sup>#</sup> (2,2; 15,7)

**sSMPD1 Aktivität** Im Vergleich zur altersgenormten, gesunden Kontrollgruppe, wiesen die Plasmaproben der Patienten mit schwerer Sepsis oder septischen Schock am Tag der Diagnosestellung signifikant höhere sSMPD1 Aktivitäten auf (Abb. 10).

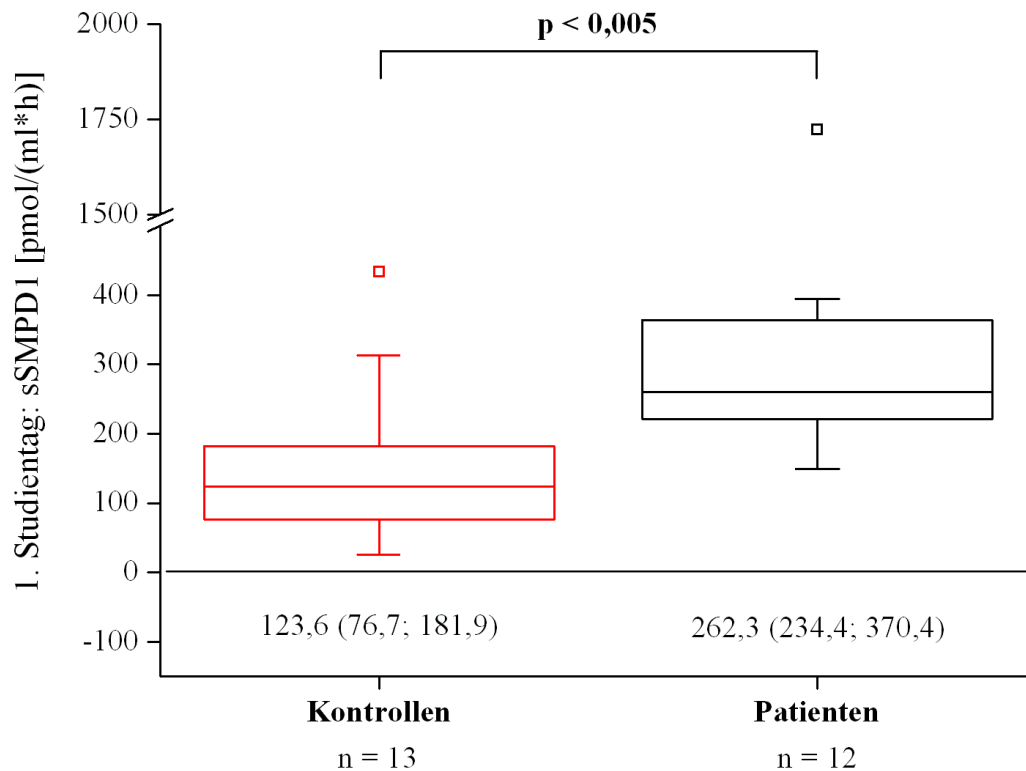


Abb. 10: Vergleich der sSMPD1 Aktivitäten der Kontrollen mit den Aktivitätswerten der septischen Patienten am ersten Studientag. Median und die Quartile (Q<sub>25%</sub>;Q<sub>75%</sub>) sind zusätzlich als Zahlenwert in der Abbildung angegeben.

Während sich für die Patientengruppe ein Median von 262,3 pmol/(ml\*h) (Q<sub>25%</sub>: 234,4 und Q<sub>75%</sub>: 370,4 pmol/(ml\*h)) ergab, lag der Median für die Aktivität in der Kontrollgruppe lediglich bei 123,6 pmol/(ml\*h) (Q<sub>25%</sub>: 76,7 und Q<sub>75%</sub>: 181,9 pmol/(ml\*h);  $p < 0,005$ ).

Ein Vergleich der Aktivitätswerte des ersten Studientages zwischen der Patientengruppe mit letalem Ausgang des septischen Geschehens und denen der Überlebenden zeigte dagegen keinen signifikanten Unterschied. Auch die im Verlauf gemessene minimale und maximale sSMPD1 Aktivität sowie die Werte am Todestag bzw. am Verlegungstag unterschieden sich aufgrund breiter Streuung und niedriger Patientenzahl nicht signifikant zwischen den beiden Subgruppen.

Bei genauerer Betrachtung der intraindividuellen Verläufe zeigte sich allerdings, dass bei 5 der 7 Verstorbenen die Maximalwerte der sSMPD1 Aktivität auf den Todestag fielen,

wohingegen 3 von 5 der Überlebenden am Verlegungstag die niedrigste im Verlauf gemessene Aktivität aufwiesen. Dieser Unterschied zwischen beiden Subgruppen drückte sich auch in einer gegenläufigen Entwicklung der sphingolytischen Aktivität über den Beobachtungszeitraum aus. Während die sphingolytische Aktivität im Plasma der an der Sepsis versterbenden Patienten im Beobachtungszeitraum um 77,4 pmol/(ml\*h) ( $Q_{25\%}$ : -2,7;  $Q_{75\%}$ : 365,8 pmol/(ml\*h)) anstieg, fiel die Aktivität in der Subgruppe der Überlebenden um 252,1 pmol/(ml\*h) ( $Q_{25\%}$ : -254,8;  $Q_{75\%}$ : -108,2 pmol/(ml\*h)) ab (Abb. 11).

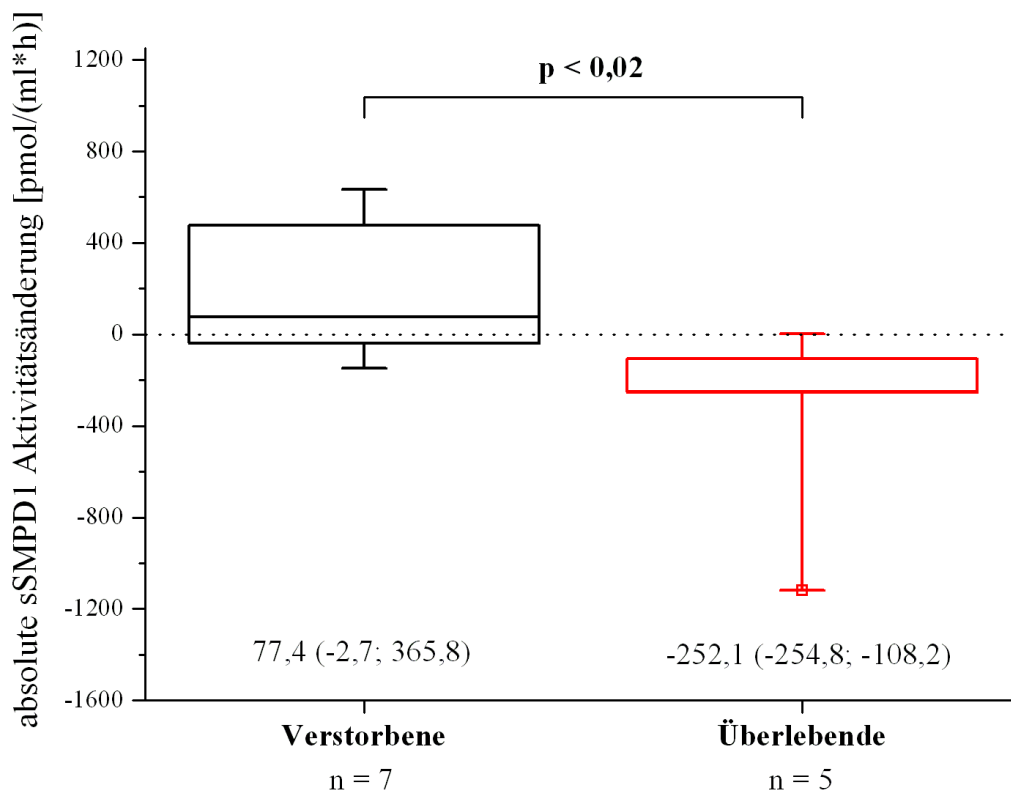


Abb. 11: Vergleich der absoluten sSMPD1 Aktivitätsänderung über den gesamten Beobachtungszeitraum (erster Studientag bis Tod oder Verlegung auf Normalstation) zwischen Verstorbenen und Überlebenden. Median und die Quartile ( $Q_{25\%}$ ;  $Q_{75\%}$ ) sind zusätzlich als Zahlenwert in der Abbildung angegeben.

Bezogen auf den erstbestimmten Wert am Tag der Diagnosestellung des septischen Krankheitsbildes entsprach dies einem prozentualen Anstieg um 23,8% ( $Q_{25\%}$ : 2,4%;  $Q_{75\%}$ : 143,9%) bzw. einem Abfall um 65,0% ( $Q_{25\%}$ : -66,9%;  $Q_{75\%}$ : -41,6%). Der Unterschied in der absoluten Aktivitätsveränderung für die beiden Subgruppen war dabei auf einem Niveau von  $p < 0,02$  signifikant.

**Vergleich der sSMPD1 Aktivität mit dem SOFA-Score und Procalcitonin** Um einen möglichen Zusammenhang zwischen der gemessenen sSMPD1 Aktivität und dem klinischen Schweregrad zu untersuchen, wurde die sSMPD1 Aktivität mit den erhobenen SOFA-Score-Werten sowie den Procalcitonin-Werten verglichen. Die Ermittlung der SOFA-Score-Werte als auch der Procalcitonin-Werte gilt als etablierte Methode, um den Schweregrad des septischen Krankheitsbildes einzuschätzen (Vincent et al. 1996, Brunkhorst et al. 2002). In beiden Fällen handelt es sich um unabhängige Marker einer ungünstigen Prognose. Bei entsprechender Analyse fanden sich signifikant höhere SOFA-Score-Werte an Tagen mit maximaler sSMPD1 Aktivität gegenüber Tagen mit minimaler sSMPD1 Aktivität (Median der Differenz: +4 Punkte 1,5/5,5,  $p(\text{einseitig}) < 0,01$ ). Ein ähnlicher Zusammenhang ergab sich für sSMPD1 und Procalcitonin (Median der Differenz: +1,84 ng/ml 0,30/13,61;  $p(\text{einseitig}) < 0,05$ ).

#### 4.1.3. sSMPD1 Aktivität bei Patienten mit chronischer Herzinsuffizienz

Alle Patienten wiesen eine symptomatische Herzinsuffizienz auf. In 66% lag eine ischämische, in 34% eine nicht-ischämische Ätiologie vor. Die mittlere NYHA Klasse lag bei  $2,5 \pm 0,1$ , mit den meisten Patienten in NYHA Klasse II ( $n=48$ ) und III ( $n=46$ ). 43 der Patienten (38%) wiesen zudem eine kardiale Kachexie auf, wie oben definiert. Die wesentlichen klinischen Merkmale der Patienten und der Kontrollen sind in Tabelle 5 zusammengefasst.

**sSMPD1 Aktivität bei CHF mit und ohne Kachexie und in Relation zu proinflammatorischen Zytokinen sowie anderer klinischer Parameter** Die Serum sSMPD1 Aktivität war vergleichbar zwischen gesunder und hypertensiver Kontrollgruppe ( $150 \pm 34$  vs.  $156 \pm 40$  pmol/ml/h;  $p > 0,5$ ). Dagegen lag die sSMPD1 Aktivität bei den Patienten mit CHF mit  $299 \pm 27$  pmol/ml/h um  $>90\%$  höher als in der gesunden Kontrollgruppe ( $p < 0,005$ ) und der hypertensiven Kontrollgruppe ( $p < 0,02$ ; ANOVA  $p < 0,002$ ; Abb.12).

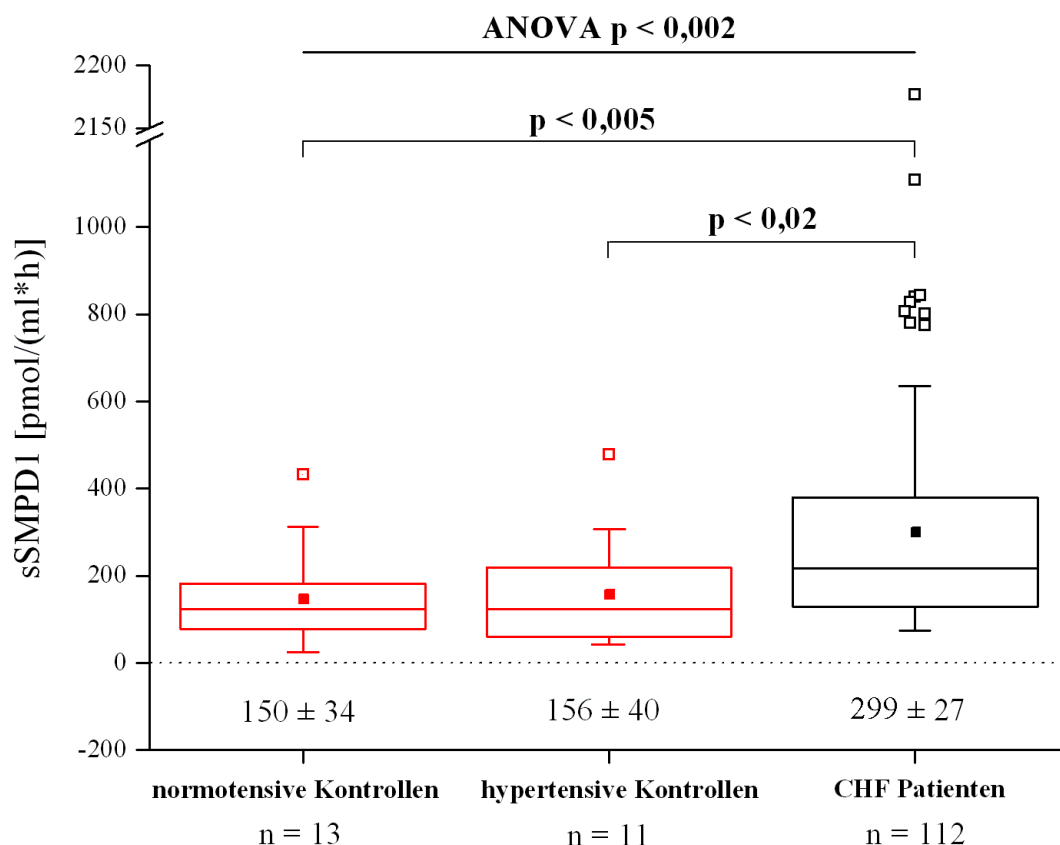


Abb. 12: Vergleich der sSMPD1 Aktivitäten zwischen normotensiven und hypertensiven Kontrollen und Patienten mit chronischer Herzinsuffizienz. Mittelwert  $\pm$  Standardfehler sind zusätzlich als Zahlenwert in der Abbildung angegeben.

Tab. 5: Vergleich verschiedener klinischer und paraklinischer Parameter zwischen gesunder, normotensiver Kontrollgruppe und herzinsuffizienter Patienten

		Kontrollgruppe (n=13)	CHF Gruppe (n=112)	p-Wert
Alter		54±4	63±1	0,006
Ätiologie				
<i>Ischämische Kardiomyopathie</i> n (%)			74 (66)	
<i>Dilatative Kardiomyopathie</i> n (%)			38 (34)	
NYHA Klasse			2,5±0,1	
I / II / III / IV			9 / 48 / 46 / 9	
ohne / mit Kachexie			69 / 43	
Systolischer Blutdruck	[mmHg]	126±5	114±2	0,08
Diastolischer Blutdruck	[mmHg]	80±3	70±1	0,01
Mittlerer Blutdruck	[mmHg]	95±3	85±1	0,02
Spitzen VO <sub>2</sub>	[ml/kg/min]	29,7±1,4	18,6±0,7	<0,0001
Dauer des Belastungstest	[sec]	729±76	464±19	0,0003
LVEF	[%]		30±2	
Kreatinin	[μmol/l]	92±4	117±5	0,1
Harnsäure	[μmol/l]	330±22	455±16	0,01
Hämoglobin	[g/dl]	14,5±0,4	13,3±0,2	0,01
Cholesteroll	[mmol/l]	5,1±0,4	5,1±0,1	0,7
Gewicht	[kg]	68,8±2,4	74,8±1,6	0,2
Body mass index	[kg/m <sup>2</sup> ]	23±0,9	24,8±0,4	0,3
Totale Fettgewebsmasse	[kg]	14,8±1,4	18,0±0,9	0,3
Zentrale Fettgewebsmasse	[kg]	8,3±0,8	10,0±0,5	0,3
Periphere Fettgewebsmasse	[kg]	5,6±0,5	6,9±0,4	0,3
Verhältnis Zentrale/periphere Fettgewebsmasse		1,5±0,1	1,5±0,1	0,9
Totale fettgewebsfreie Körpermasse	[kg]	52,7±16,8	52,9±9,1	0,9
Periphere fettgewebsfreie Körpermasse	[kg]	23,4±0,4	22,17±4,6	0,5
sSMPD1	[pmol/ml*h]	150,3±33,7	299,3±26,8	0,003
TNF-α	[pg/ml]	21,54±6,0	32,19±2,9	0,40
sTNF-α R1	[pg/ml]	1425±138	2140±126	0,014

Kein signifikanter Unterschied der sphingolytischen Aktivität fand sich zwischen den Patienten mit ischämischer und nicht-ischämischer Ätiologie bzw. idiopathischer dilatativer Kardiomyopathie.

Beim Vergleich der Aktivitätswerte unter den verschiedenen NYHA-Klassen zeigte sich im Trend ein schrittweiser Anstieg der Aktivität parallel zur Zunahme des Schweregrades des CHF (Kontrollen:  $150,3 \pm 33,7$ ; NYHA I:  $205,9 \pm 67,4$ ; II:  $284,4 \pm 35,0$ ; III:  $305,6 \pm 31,2$ ; IV:  $439,9 \pm 221,6$  pmol/ml/h; ANOVA  $p < 0,05$ ; Abb. 13).

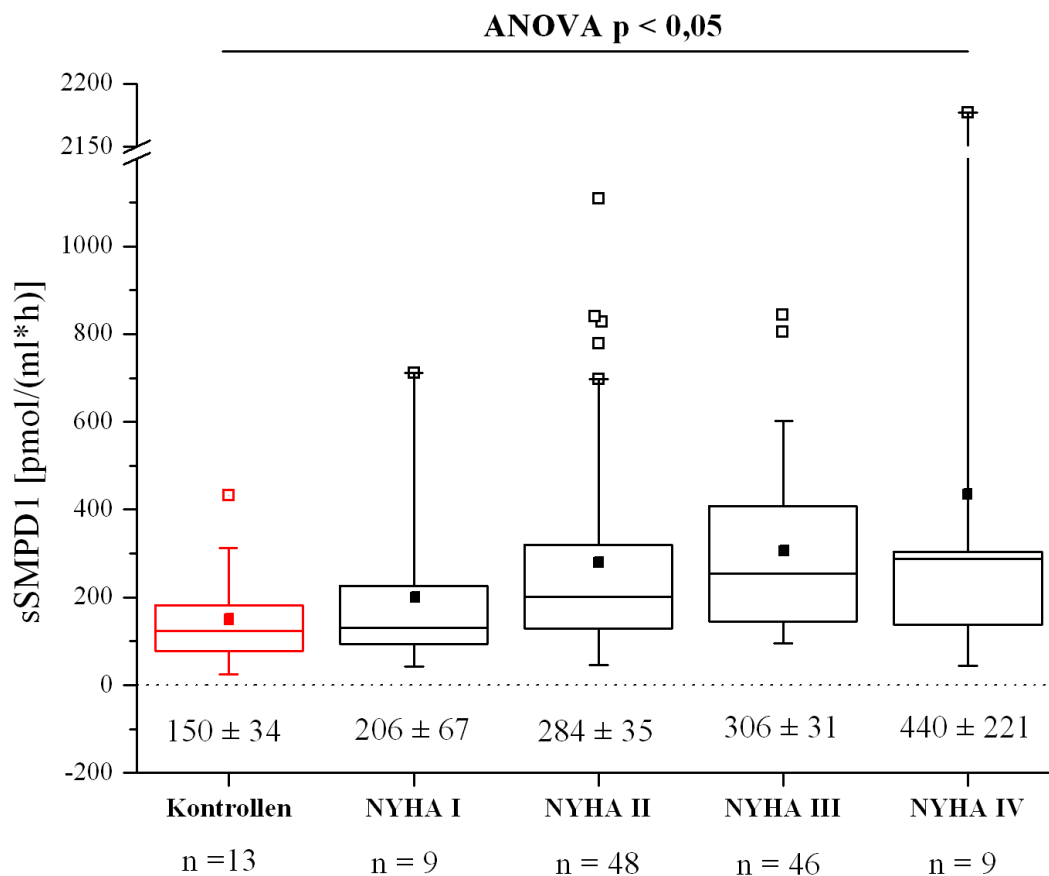


Abb. 13: Vergleich der sSMPD1 Aktivität zwischen der gesunden, normotensiven Kontrollgruppe und den herzinsuffizienten Patienten mit entsprechendem Schweregrad der Herzinsuffizienz (NYHA I – IV). Mittelwert  $\pm$  Standardfehler sind zusätzlich als Zahlenwert in der Abbildung angegeben.

Bei Subgruppenanalyse der CHF Patienten mit und ohne kardialer Kachexie, ergab sich eine signifikant erhöhte sSMPD1 Aktivität bei den kachektischen CHF Patienten im Vergleich zu derer der Patienten ohne Kachexie (nicht-kachektische CHF:  $233,2 \pm 24,3$  vs. kachektische CHF:  $405,2 \pm 54,4$  pmol/(ml\*h);  $p < 0,001$ ; Abb. 14).

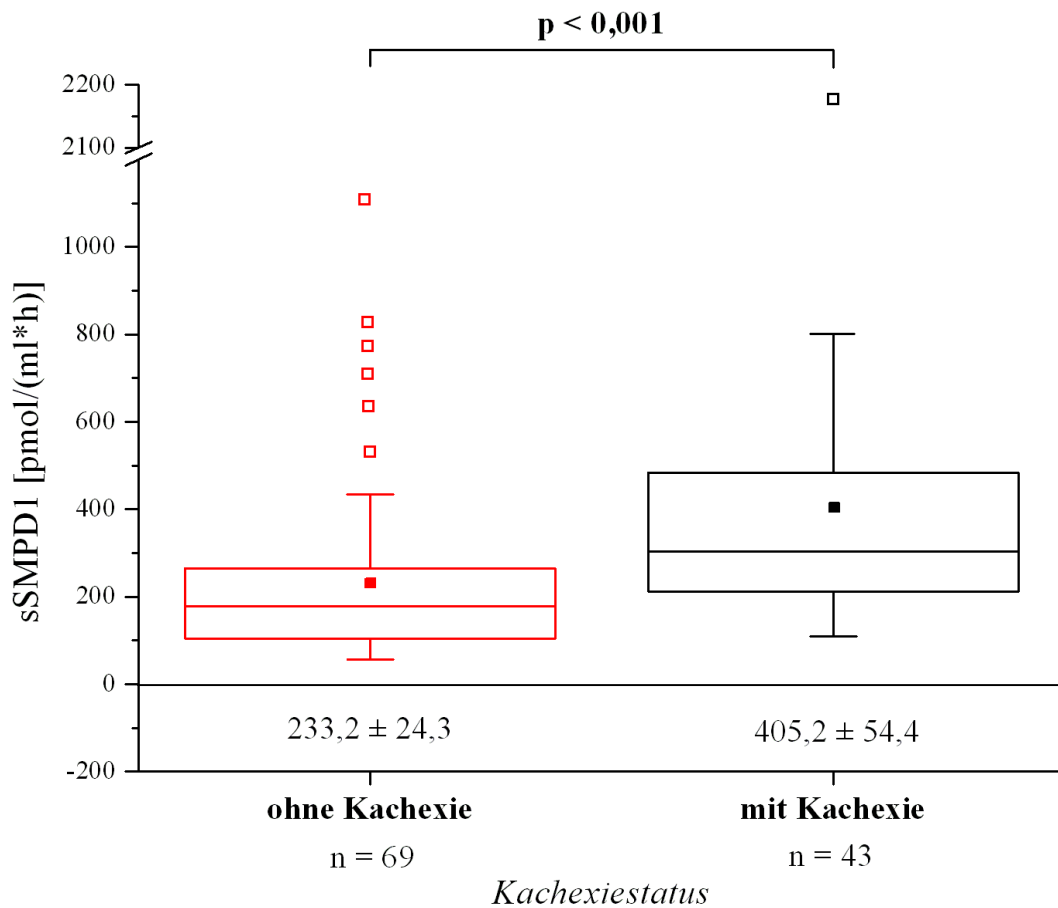


Abb. 14: Vergleich der sSMPD1 Aktivität herzinsuffizienter Patienten in Abhängigkeit vom Kachexiestatus. Mittelwert  $\pm$  Standardfehler sind zusätzlich als Zahlenwert in der Abbildung angegeben.



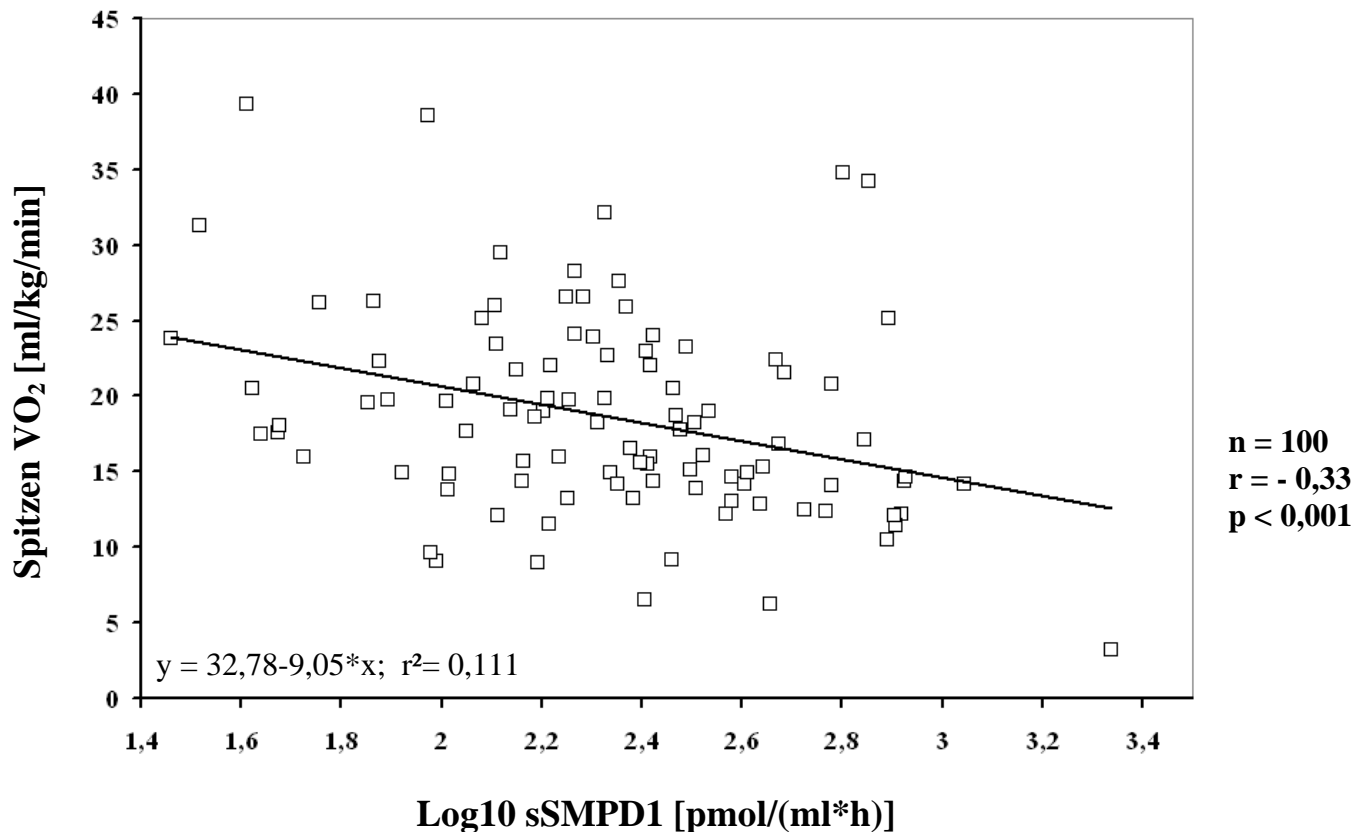


Abb. 15: Regressionsanalyse. Einfluss der sSMPD1 Aktivität auf den Spitzensauerstoffverbrauch (Spitzen  $\text{VO}_2$ ). In der Abbildung sind Funktionsvorschrift der Regressionsgeraden und das Bestimmtheitsmaß  $r^2$  angegeben.  $r$  kennzeichnet den Pearson Korrelationskoeffizienten.

Bei der univariaten Regressionsanalyse zeigte sich ein signifikanter, inverser Zusammenhang zwischen sSMPD1 Aktivität und einigen wichtigen klinischen Parametern wie dem Spitzen  $\text{VO}_2$  ( $r = -0,33$ ;  $p < 0,001$ ; Abb. 15), dem Kreatinin und der Harnsäure (beide  $p < 0,001$ ). Zudem ergab sich eine positive Korrelation mit den proinflammatorischen Zytokinmarkern  $\text{TNF-}\alpha$  ( $r = 0,20$ ;  $p < 0,05$ ) und s $\text{TNF-}\alpha$  RI ( $r = 0,35$ ;  $P < 0,0005$ ; Tabelle 6). Keine Korrelation fand sich dagegen zwischen sSMPD1 Aktivität und globalen hämodynamischen Parametern wie linksventrikulärer Ejektionsfraktion und mittlerem arteriellen Blutdruck.

Tab. 6: Korrelationen zwischen sSMPD1 Aktivität und verschiedenen klinischen und paraklinischen Parametern herzinsuffizienter Patienten

		Korrelations- koeffizient (r)	p-Wert
Alter		0,29	0,002
Mittlerer Blutdruck	[mmHg]	-0,15	0,12
LVEF	[%]	-0,047	0,69
Kreatinin	[ $\mu$ mol/l]	0,36	0,0003
Harnsäure	[ $\mu$ mol/l]	0,35	0,0005
Hämoglobin	[g/dl]	-0,21	0,058
Cholesterol	[mmol/l]	0,12	0,24
Gewicht	[kg]	-0,20	0,038
Body mass index	[kg/m <sup>2</sup> ]	-0,25	0,0086
Totale Fettgewebssmasse	[kg]	-0,169	0,11
Zentrale Fettgewebssmasse	[kg]	-0,14	0,19
periphere Fettgewebssmasse	[kg]	-0,19	0,06
Verhältnis zentrale/periphere Fettgewebssmasse	[kg]	0,14	0,19
Totale fettgewebssfreie Körpermasse	[kg]	-0,34	0,001
Zentrale fettgewebssfreie Körpermasse	[kg]	-0,23	0,026
Periphere fettgewebssfreie Körpermasse	[kg]	-0,37	0,0003
TNF- $\alpha$	[pg/ml]	0,224	0,018
sTNF- $\alpha$ R1	[pg/ml]	0,387	<0,0001

**sSMPD1 Aktivität und körperliche Konstitution** Da sich die sSMPD1 Aktivität unter den kachektischen Patienten als stark erhöht erwies, stellte sich die Frage, ob die sSMPD1 ferner mit dem BMI der jeweiligen Patienten korreliert und ob sich ein statistischer Zusammenhang der sSMPD1 Aktivität mit einer bestimmten körperlichen Konstitution, bestimmt mittels DEXA Scan, herausstellen würde (Tab. 6). Tatsächlich ergab sich eine negative Korrelation zwischen sSMPD1 und BMI ( $r=-0,25$ ;  $p<0,01$ ), der fettgewebssfreien Körpermasse sowie der regionalen Verteilung (totale fettgewebssfreie Körpermasse:  $r=-0,34$ ;  $p=0,001$ ; periphere fettgewebssfreie Körpermasse:  $r=-0,37$   $p<0,0005$ ). Dagegen wurde kein Zusammenhang zwischen sSMPD1 Aktivität und Fettgewebssmasse gefunden.

**Skelettmuskelleistung und Blutfluss** Da sich eine negative Korrelation der sSMPD1 Aktivität mit dem unter Belastung gemessenen Spitzensauerstoffverbrauch und der fettgewebefreien Körpermasse ergab, stellte sich die Frage, ob sich dies ferner in einem statistischen Zusammenhang von sSMPD1 Aktivität und eingeschränktem peripheren Blutfluss, wie auch eingeschränkter Muskelfunktion widerspiegeln würde. Beide Parameter gelten als Determinanten der oxidativen Kapazität (Anker et al. 2004).

In der Tat fand sich ein statistisch signifikanter, inverser Zusammenhang zwischen maximaler isometrischer Muskelstärke des M. quadriceps und der sphingolytischen Aktivität im Serum ( $r=-0,46$ ;  $p<0,0001$ ; Abb. 16). Nach Korrektur der gemessenen Muskelstärke für die Muskelquerschnittsfläche fiel diese Korrelation zwischen muskulärer Leistung und sSMPD1 Aktivität sogar noch stärker aus ( $r=-0,67$ ;  $p<0,0001$ , Abb. 17). Darüber hinaus fand sich außerdem eine negative Korrelation zwischen sSMPD1 Aktivität und am Unterarm gemessenem postischämischen Spitzenblutfluss ( $r=-0,34$ ;  $p=0,02$  Abb. 18) wie auch dem Verhältnis Spitzen- und Ruheblutfluss ( $r=-0,32$ ;  $p=0,039$ , Abb. 19).

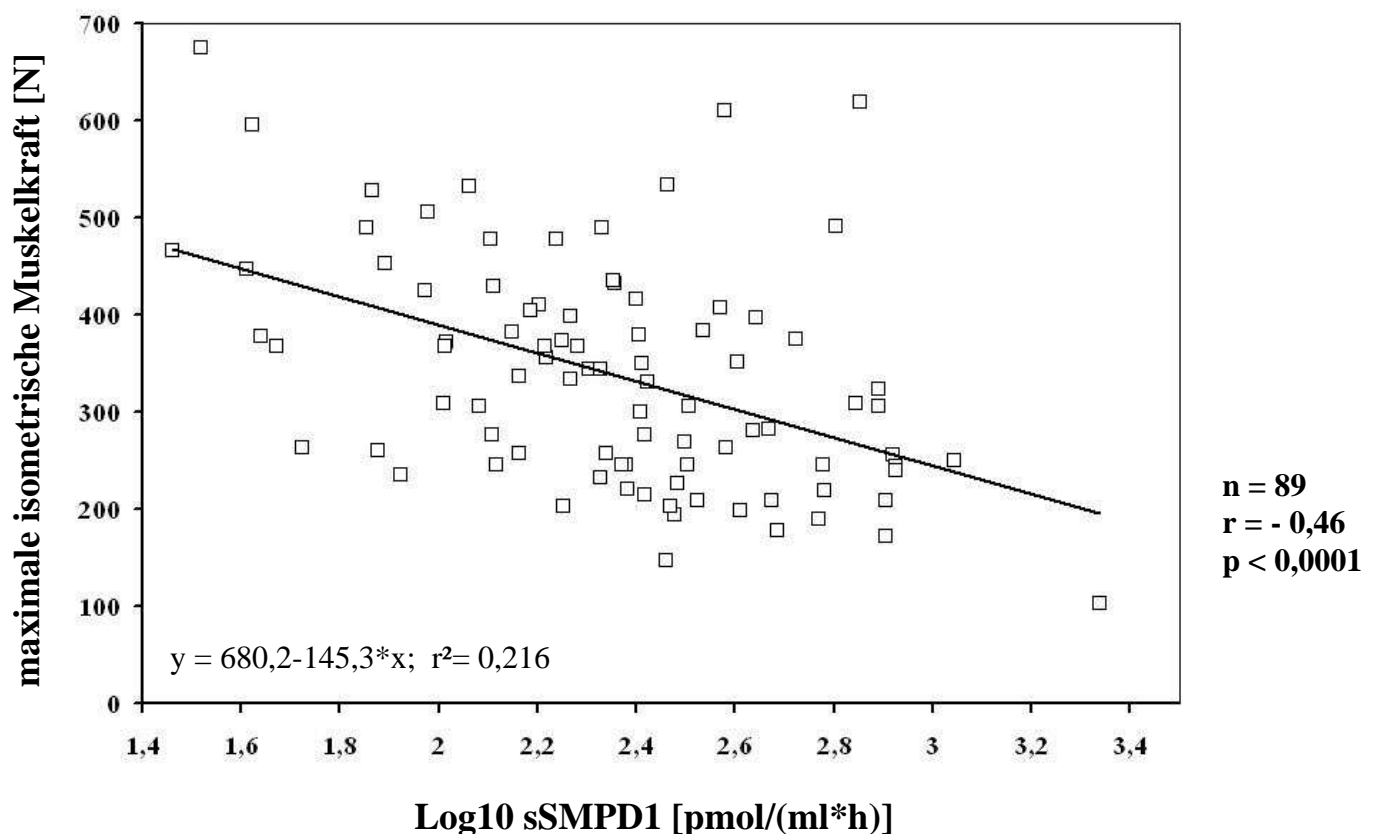


Abb. 16: Regressionsanalyse. Einfluss der sSMPD1 Aktivität auf die maximale isometrische Muskelkraft. In der Abbildung sind Funktionsvorschrift der Regressionsgeraden und das Bestimmtheitsmaß  $r^2$  angegeben.  $r$  kennzeichnet den Pearson Korrelationskoeffizienten.

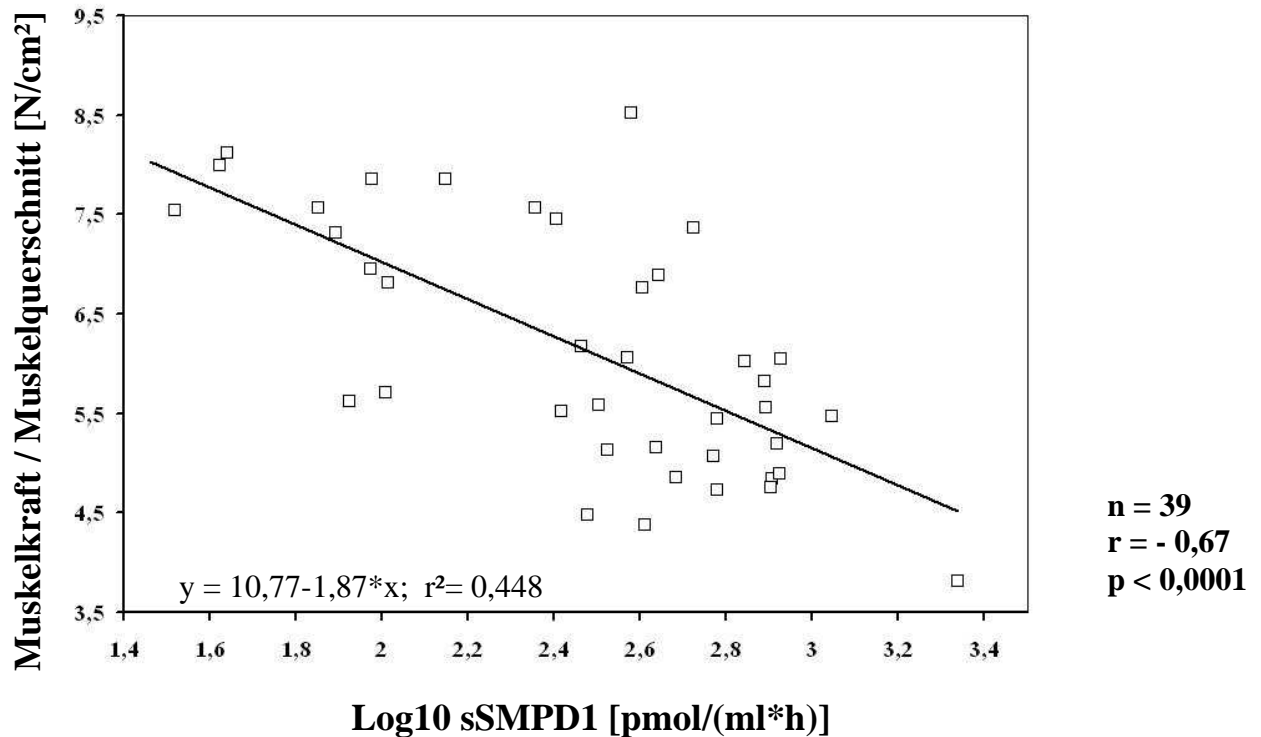


Abb. 17: Regressionsanalyse. Einfluss der **sSMPD1** Aktivität auf die maximale isometrische Muskelkraft pro cm² Muskelquerschnitt. In der Abbildung sind Funktionsvorschrift der Regressionsgeraden und das Bestimmtheitsmaß **r²** angegeben. **r** kennzeichnet den Pearson Korrelationskoeffizienten.

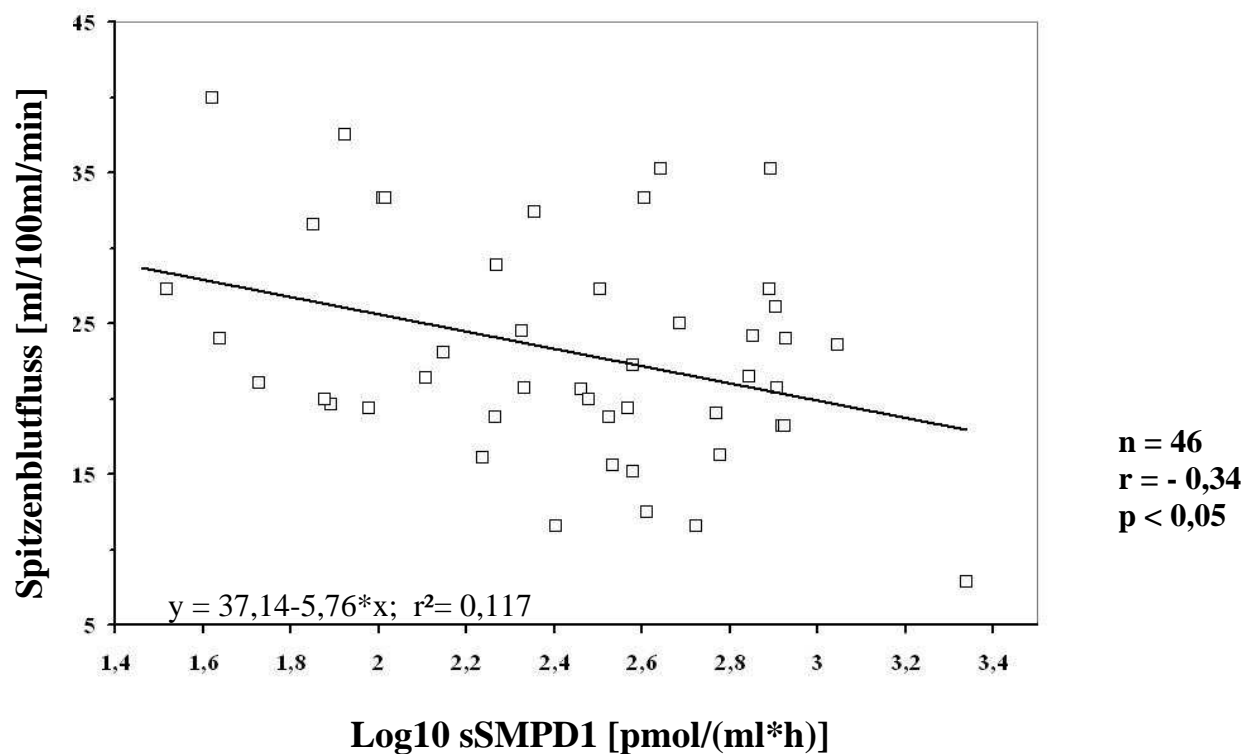


Abb. 18: Regressionsanalyse. Einfluss der **sSMPD1** Aktivität auf den Spitzenblutfluss. In der Abbildung sind Funktionsvorschrift der Regressionsgeraden und das Bestimmtheitsmaß **r²** angegeben. **r** kennzeichnet den Pearson Korrelationskoeffizienten.

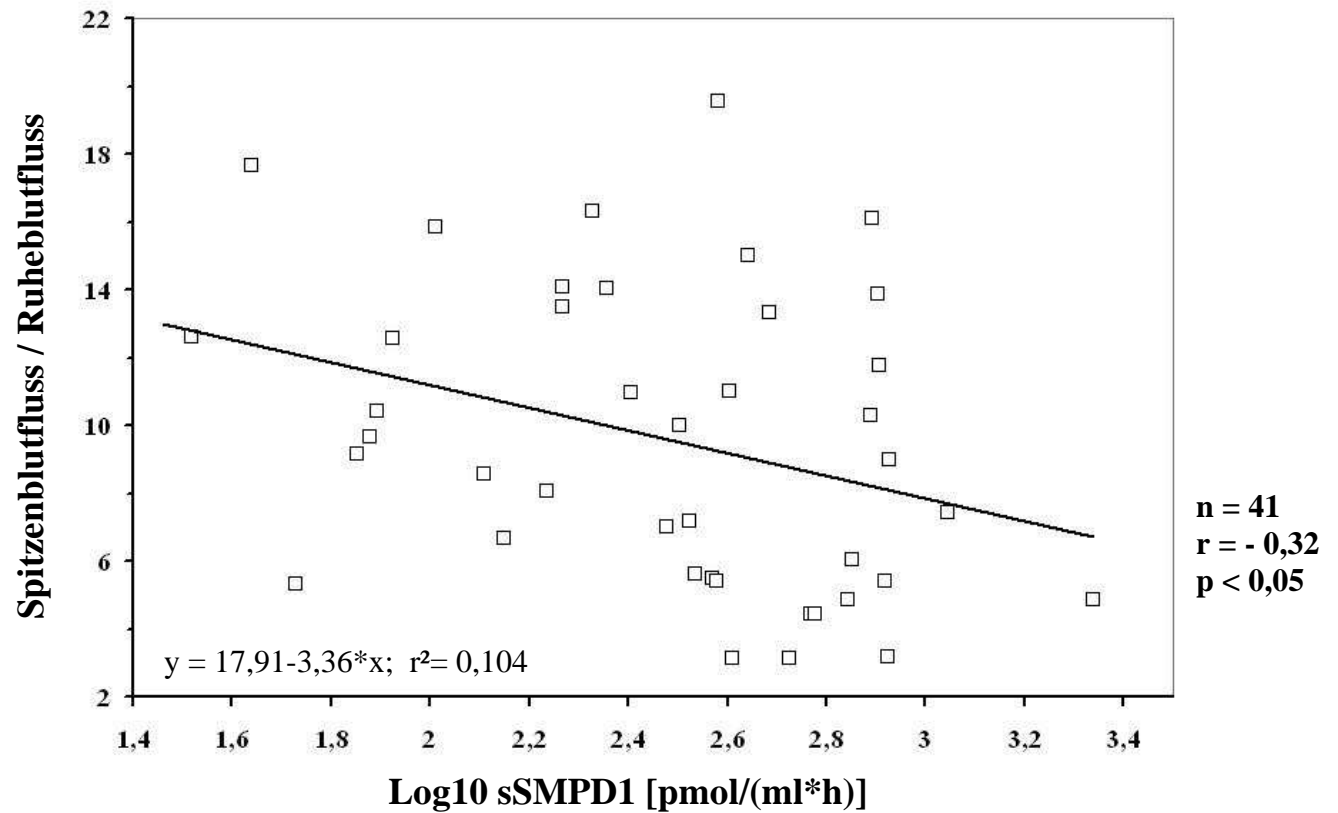


Abb. 19: Regressionsanalyse. Einfluss der **sSMPD1** Aktivität auf das Verhältnis Spitzen-/Ruheblutfluss als Maß der vasodilatatorische Kapazität. In der Abbildung sind Funktionsvorschrift der Regressionsgeraden und das Bestimmtheitsmaß  $r^2$  angegeben.  $r$  kennzeichnet den Pearson Korrelationskoeffizienten.

## 4.2. Steigerung der enzymatischen sSMPD1 Aktivität durch oxidativen Stress

Im Rahmen von Inflammationsprozessen lässt sich ein vermehrter Anfall von reaktiven Sauerstoffspezies beobachten. Vor dem Hintergrund einer Aktivitätssteigerung der rekombinanten sauren Sphingomyelinase unter oxidativen Bedingungen (Qui et al. 2003) untersuchten wir den Einfluss der durch den Radikalbildner AAPH freigesetzten reaktiven Sauerstoffspezies auf die sphingolytische Aktivität im Plasma von 12 gesunden Freiwilligen untersucht.

Das Alter der gesunden Probanden betrug im Mittel 25 Jahre. Die sSMPD1 Aktivität lag bei  $122,7 \pm 21,5$  pmol/(ml\*h) für den einfachen Ansatz (1). Die Hinzugabe von Ascorbinsäure bewirkte keine wesentliche Aktivitätsänderung ( $117,8 \pm 19,9$  pmol/(ml\*h)). Wurde dem Ansatz allerdings der Radikalbildner AAPH beigelegt, war ein signifikanter Anstieg der sSMPD1 Aktivität auf  $207,2 \pm 26,1$  pmol/(ml\*h) zu verzeichnen (Ansatz (1) vs. (3):  $p < 0,00002$ ).

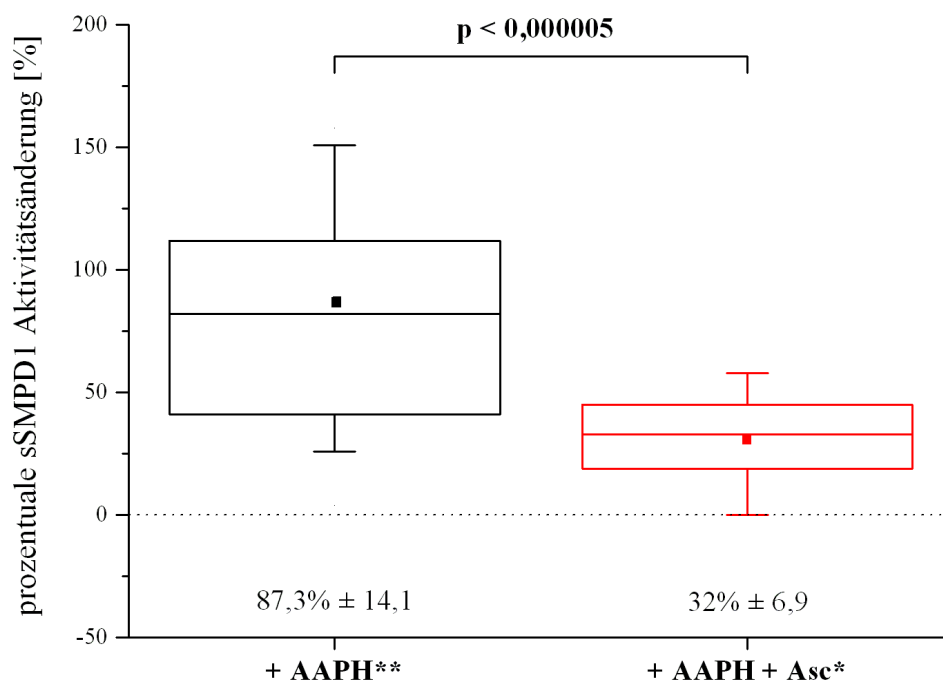


Abb. 20: Prozentualer sSMPD1 Aktivitätsanstieg nach Inkubation mit AAPH oder AAPH und Ascorbinsäure (Asc). Mittelwert  $\pm$  Standardfehler sind zusätzlich als Zahlenwert in der Abbildung angegeben. \*\* ( $p < 0,00002$ ) und \* ( $p < 0,001$ ) kennzeichnen den signifikanten Unterschied im Vergleich zum Ansatz ohne Zusatz.

Bezogen auf die Aktivitätswerte im Ansatz (1) entsprach dies einem Aktivitätszuwachs um  $87,3\% \pm 14,1\%$  (Abb. 20). Dieser Aktivitätsanstieg war erheblich abgemildert bei zusätzlicher Hinzugabe von Ascorbinsäure. In Ansatz (4) stieg die sSMPD1 Aktivität um lediglich  $32\% \pm 6,9\%$  auf  $149,8 \pm 20,1$  pmol/(ml\*h). Allerdings handelte es sich auch hierbei noch um einen signifikanten Aktivitätszuwachs im Vergleich zu den für Ansatz (1) gemessenen Werten (Ansatz (1) vs. (4):  $p < 0,001$ ). Der antioxidative Effekt der Ascorbinsäure drückte sich überdies in einem signifikanten Unterschied der sSMPD1 Aktivitätswerte zwischen Ansatz (3) und (4) aus ( $p < 0,000005$ ).

## 5. Diskussion

Eine Aktivierung des Sphingomyelinstoffwechsels wird im Zusammenhang mit der zellulären Stressantwort und den Signalprozessen der Inflamationsreaktion beobachtet (Mathias et al. 1998, Baumruker und Prieschl 2002). Dass sich diese Aktivierung auch in messbaren Veränderungen von Metaboliten des Sphingomyelinstoffwechsels im Blut niederschlägt, konnten erste Studien an Patienten mit systemischer Inflammation zeigen (Delogu et al. 1999, Drobnik et al. 2003, Lightle et al. 2003, Takahashi et al. 2002). Mit der Spaltung des inerten Sphingomyelins zu Ceramid steht die Sphingomyelinase am Beginn des katabolen Sphingomyelinstoffwechsels und nimmt somit eine Schlüsselrolle in der Aktivierung dieses Stoffwechselweges ein. Unsere Ergebnisse liefern nun einen weiteren Anhalt (Takahashi et al. 2002) dafür, dass sich ein systemisches Entzündungsgeschehen auch in einer veränderten enzymatischen Aktivität der sezernierten Sphingomyelinase im humanen Blut widerspiegelt. Die beobachteten Aktivitäten im Blut überstiegen dabei sowohl bei den untersuchten Patientengruppen als auch in der gesunden Kontrollgruppe die enzymatische Aktivität, für die ein biologischer Effekt in Zellkultursystemen berichtet worden war (Loidl et al. 2003 und 2004). Unabhängig von der Chronizität des Inflammationsgeschehens ließen sich sowohl bei den Patienten mit akutem Inflammationszustand als auch bei den Patienten mit Herzinsuffizienz und chronischem Inflammationszustand gegenüber der Kontrollgruppe erhöhte sSMPD1 Aktivitäten im Blut nachweisen. Darüber hinaus stützen unsere Ergebnisse die Vermutung, dass sich die Schwere der Inflamationsreaktion im Ausmaß der Veränderungen des Sphingomyelinstoffwechsels abbildet.

### 5.1. sSMPD1 Aktivität in Abhängigkeit von der Schwere der Inflamationsreaktion

#### 5.1.1. *Patienten mit elektivem herzchirurgischen Eingriff*

In einer ersten Patientengruppe untersuchten wir den Einfluss zweier unterschiedlicher kardiochirurgischer Verfahren auf das Ausmaß der Immunaktivierung und die Folgen für die sphingolytische Aktivität im Plasma. Die beiden Verfahren unterschieden sich in Invasivität und Schwere des resultierenden chirurgischen Traumas. Während bei den konventionell operierten Patienten die Herzlungenmaschine eingesetzt worden war, erfolgte im alternativen MIDCAB Verfahren die Operation am schlagenden Herzen ohne Stilllegung des Herzmuskels. Darüber hinaus wurde im letzteren Fall ein Zugangsweg über eine anterolaterale Thorakotomie anstelle der mediane Sternotomie gewählt. Unter der Voraussetzung einer begrenzten kardiovaskulären Pathologie (1-2 Gefäßerkrankung) stellt das



MIDCAB Verfahren somit eine wesentlich schonendere Alternative gegenüber der konventionellen Methode dar (Subramanian und Patel 2001). Es ist bekannt, dass sowohl der Einsatz der HLM als auch die Schwere des chirurgischen Traumas entscheidenden Einfluss auf das Ausmaß der Immunaktivierung nehmen (Wan et al. 1997). In einer ganzen Reihe von Studien konnte nachgewiesen werden, dass sich ein Verzicht des Einsatzes der extrakorporalen Zirkulation auch in einer beträchtlichen Reduktion der Zytokinantwort sowie des oxidativen Stresses widerspiegelt (Vallely et al. 2001, Tomic et al. 2005)

Entsprechende Auswirkungen des chirurgischen Eingriffs ließen sich auch bei den von uns untersuchten herzchirurgischen Patienten beobachten. Erwartungsgemäß war der Konzentrationsanstieg der proinflammatorischen Zytokine TNF- $\alpha$  und IFN- $\gamma$ , die beide als jeweils unabhängiger Stimulus für die sSMPD1 Sekretion gelten (Marathe et al. 1998., Wong et al. 2000), in der HLM Gruppe wesentlich ausgeprägter und ließ sich bereits kurz nach dem Eingriff nachweisen. Gleichmaßen verhielt sich die sSMPD1 Aktivität. Patienten, die nach dem MIDCAB Verfahren operiert worden waren, wiesen dagegen eine wesentlich geringere und verzögerte Zytokinantwort und einen dementsprechend moderateren sSMPD1 Aktivitätsanstieg auf. Tatsächlich könnten im Fall des konventionellen Verfahrens die Auswirkungen der höheren Invasivität, des größeren chirurgischen Traumas und der längeren Operationsdauer auf Zytokinantwort und Aktivität des Sphingomyelinstoffwechsels noch wesentlich gravierender sein, als dies die Ergebnisse der Plasmakonzentrationen auf den ersten Blick vermuten lassen. Der signifikant niedrigere Hämatokritwert in der HLM Gruppe lässt nämlich auf einen größeren Blutverlust bzw. eine stärkere Hämodilution schließen. Unter Berücksichtigung eines entsprechenden Verdünnungseffekts bilden im Fall des invasiveren Verfahrens die erhöhten Zytokinkonzentrationen und die gesteigerte sSMPD1 Aktivität somit das Ausmaß der Aktivierung des Immunsystems und des Sphingomyelinstoffwechsels möglicherweise nur unvollständig ab.

Unabhängig von der Invasivität des Verfahrens entwickelten 17 Patienten als Folge des chirurgischen Eingriffs die klinischen Zeichen einer systemischen Inflammationsreaktion (SIRS). Bei 10 Patienten persistierte dieser Zustand am ersten postoperativen Tag. Diese Patienten wiesen eine signifikant höhere sSMPD1 Aktivität auf als die Patienten ohne entsprechendes klinisches Bild.

### *5.1.2. Patienten mit schwerer Sepsis oder septischem Schock*

Die Untersuchung einer zweiten Patientengruppe mit Sepsis zeigte, dass sich auch hier eine erhöhte Aktivität der sezernierten Sphingomyelinase nachweisen lässt. Bei der Sepsis handelt es sich um ein Krankheitsbild, welches den komplizierten Verlauf einer ganzen Reihe von Erkrankungen vor infektiösem Hintergrund darstellt (Bone et al. 1997). Unterschiedliche Komorbiditäten können Einfluss auf den Verlauf des septischen Krankheitsgeschehens nehmen.

Deshalb haben wir für unsere Untersuchung dieser Patientengruppe bewusst ein möglichst heterogenes Patientenkollektiv herangezogen, um so die allgemeine Bedeutung von Veränderungen der sSMPD1 Aktivitäten bei kritisch Kranken aufzuzeigen. Unterschiede bestanden in der Art der nachgewiesenen Infektionsquelle, in der Art der Begleiterkrankungen und im Schweregrad des septischen Krankheitsbildes (Tab. 3, Anhang). Trotz dieser Heterogenität ließ sich eine signifikant erhöhte sSMPD1 Aktivität für die Patientengruppe gegenüber der Kontrollgruppe beobachten. Interessanterweise zeigten Patienten, die das septische Geschehen überlebten, im Verlauf des Beobachtungszeitraumes einen Abfall der sSMPD1 Aktivität. Patienten mit letalem Ausgang wiesen dagegen eher einen präfinalen Anstieg der sSMPD1 Aktivität im Vergleich zum Ausgangswert auf. Die gegenläufige Entwicklung der sSMPD1 Aktivitäten in Abhängigkeit vom Ausgang der Erkrankung ließ eine statistisch signifikante Differenzierung dieser beiden Subgruppen zu. Die sphingolytische Aktivität im Plasma scheint somit parallel mit dem Schweregrad des septischen Krankheitsbildes zu verlaufen. Dies drückte sich auch darin aus, dass SOFA-Scores und Procalcitoninwerte, beides Marker für eine ungünstige Prognose, an Tagen mit maximaler sSMPD1 Aktivität höhere Werte aufwiesen als an Tagen mit minimaler sSMPD1 Aktivität.

### *5.1.3. Patienten mit chronischer Herzinsuffizienz*

Schließlich belegen unsere Ergebnisse zur sSMPD1 Aktivität bei Patienten mit chronischer Herzinsuffizienz, dass die Aktivierung des Sphingomyelinstoffwechsels auch bei chronischen Inflammationszuständen eine Rolle zu spielen scheint. Auch bei den Patienten mit Herzinsuffizienz ergaben sich signifikant erhöhte sSMPD1 Aktivitätswerte im Serum im Vergleich zu einem gleichaltrigen gesunden Kontrollkollektiv. Dabei fand sich eine erhöhte Aktivität unabhängig von der Ätiologie sowohl bei ischämischer als auch nicht-ischämischer Genese der Herzschwäche. Vergleichbar mit den Ergebnissen bei akuten Inflammationszuständen ergab sich auch im Falle der chronischen Herzinsuffizienz eine

Abhängigkeit der sSMPD1 Aktivität von der Schwere der klinischen Symptomatik. So ließ sich ein gradueller Anstieg der sSMPD1 Aktivität von NYHA Klasse I bis IV beobachten. Allerdings ergab der Vergleich der jeweiligen Aktivitätswerte für die einzelnen NYHA-Klassen untereinander keine signifikanten Unterschiede. Auch wenn es sich bei dem beobachteten Anstieg somit nur um einen Trend handelte, lässt dies dennoch einen Zusammenhang zwischen dem Schweregrad der Herzinsuffizienz und der gemessenen sphingolytischen Aktivität vermuten. Gleichermäßen lässt sich die beobachtete Korrelation zwischen beeinträchtigter maximaler Sauerstoffaufnahmekapazität, einem Maß für die individuelle Leistungsfähigkeit (Anker et al. 1997b), und der sSMPD1 Aktivität interpretieren. Ferner fand sich eine Korrelation mit dem löslichen TNF- $\alpha$  Rezeptor 1 und der Harnsäure, beides starke und unabhängige Marker für eine ungünstige Prognose der chronischen Herzinsuffizienz (Rauchhaus et al. 2000, Anker et al. 2003).

## **5.2. Mechanismen, die zu einer gesteigerten sSMPD1 Aktivität führen**

Möglicherweise sind im Rahmen von akuten und chronischen Inflammationszuständen eine ganze Reihe von Mechanismen für den von uns beobachteten sSMPD1 Aktivitätsanstieg verantwortlich.

### *5.2.1. Der Einfluss von Zytokinen auf die sSMPD1 Aktivität*

Bis zum jetzigen Zeitpunkt wurde den Zytokinen, insbesondere TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  und IFN $\gamma$ , dem PAF und den Lipopolysacchariden die wesentliche Bedeutung in einer Steigerung der sSMPD1 Aktivität im Blut beigemessen (Marathe et al. 1998, Wong et al. 2000, Göggel et al. 2004). Wie von Marathe et al. beschrieben wird die sezernierte Sphingomyelinase als Reizantwort auf eine Stimulation mit Endotoxin und proinflammatorischen Zytokine durch Endothelzellen nach apikal und basolateral freigesetzt (Marathe et al. 1998).

Eine Zytokin-induzierte Sekretion von sSMPD1 ins Blut scheint auch im Fall der von uns untersuchten Patientengruppen von Bedeutung zu sein. Sowohl in der herzchirurgischen Patientengruppe als auch bei den Patienten mit chronischer Herzinsuffizienz bestand ein Zusammenhang zwischen der Konzentration proinflammatorischer Zytokine und der sSMPD1 Aktivität im Blut.

In den herzchirurgischen Patientengruppen waren parallel zur sSMPD1 Aktivität die Konzentrationen der proinflammatorischen Zytokine IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$  und IL1- $\beta$  bestimmt worden. Ein Vergleich der Zytokin-Daten mit der sSMPD1 Aktivität zeigte, dass sich diese

gleichsinnig veränderten und dabei eine ähnliche Verlaufscharakteristik aufwiesen. In der HLM Gruppe stieg die sSMPD1 gemeinsam mit den Zytokinen bereits während der Operation oder unmittelbar danach an. Interessanterweise blieb die sSMPD1 Aktivität in dieser Gruppe aber auch zum zweiten postoperativen Messpunkt erhöht, während sich die Konzentrationen der Zytokine bereits wieder dem präoperativen Niveau annäherten. Dies lässt eine längere Halbwertszeit der sSMPD1 vermuten. Damit würden auch die Effekte auf den Sphingomyelinstoffwechsel als Folge des operativen Eingriffs länger fortbestehen.

In der MIDCAB Gruppe ließ sich unmittelbar nach dem operativen Eingriff weder für die drei bestimmten Zytokine noch für die sSMPD1 Aktivität ein signifikanter Anstieg beobachten. Erst 20 Stunden nach der Operation war die IFN- $\gamma$  Konzentration signifikant angestiegen und erst jetzt ließ sich auch für die sSMPD1 Aktivität ein gleichermaßen moderater Anstieg verzeichnen.

Wie erwartet fanden sich auch im Fall der herzinsuffizienten Patienten erhöhte Zytokinkonzentrationen. Hyperzytokinämie (v.a. erhöhte TNF- $\alpha$  Spiegel) und erhöhte Endotoxin Plasmaspiegel sind charakteristische Merkmale der chronischen Herzinsuffizienz (Rauchhaus et al. 2000, Genth-Zotz et al. 2002). Die beobachteten Korrelationen zwischen sSMPD1 Aktivität auf der einen und TNF- $\alpha$  sowie löslichem TNF- $\alpha$  Rezeptor 1 auf der anderen Seite lassen auch in dieser Patientengruppe eine Zytokin-vermittelte Freisetzung von sSMPD1 vermuten.

Auf eine Zytokinbestimmung bei den Patienten mit septischen Krankheitsbild wurde verzichtet, da Zytokine in der Verlaufsbetrachtung der Sepsis weder diagnostische noch prognostische Wertigkeit besitzen (Brunkhorst et al. 2002).

Welche Zelltypen im Rahmen der untersuchten systemischen Inflammationszustände an einer Sekretion der sSMPD1 beteiligt sind, lässt sich nicht abschließend beantworten. Bisher werden Endothelzellen als Hauptquelle für die sSMPD1 Aktivität im Blut angesehen (Tabas 1999). Allerdings sind auch hier organspezifische Unterschiede denkbar, die sich beispielsweise nur durch gezielte Probeentnahmen aus dem venösen Abflussgebiet eines jeden Organs aufdecken ließen.

Unklar bleibt bisher auch, ob eine gesteigerte sSMPD1 Sekretion ins Blut auch von einer vermehrten Abgabe in Richtung Gefäßwand begleitet wird. Eine Reihe von Untersuchungen unterstreicht die Bedeutung von sSMPD1 in der Pathogenese der Arteriosklerose (Marathe et al. 1998 und 1999). Darüber hinaus fanden Gorska et al. eine erhöhte sSMPD1 Aktivität im Serum von Typ II Diabetikern (Gorska et al. 2003). Inwieweit diese erhöhte sphingolytische

Aktivität im Blut allerdings an der Ausbildung der Arteriosklerose bei Diabetikern beteiligt ist, konnten sie nicht klären. Im Fall unserer Patienten mit chronischer Herzinsuffizienz konnten wir keinen Zusammenhang zwischen sphingolytischer Aktivität im Serum und arteriosklerotischer Erkrankung feststellen. Patienten mit ischämischer oder nicht-ischämischer Genese ihrer Herzinsuffizienz unterschieden sich nicht signifikant in den beobachteten sSMPD1 Aktivitäten. Auch der fehlende Aktivitätsunterschied zwischen der hypertensiven Kontrollgruppe mit erhöhtem Arterioskleroserisiko und der normotensiven, gesunden Kontrollgruppe lässt vermuten, dass eine Sekretion nach apikal oder basolateral jeweils einer separaten Regulation unterliegt.

### 5.2.2. *sSMPD1 Aktivität und oxidativer Stress*

Neben der Freisetzung von Zytokinen spielt auch die vermehrte Bildung von reaktiven Sauerstoffspezies eine zentrale Rolle in der Pathophysiologie der systemischen Inflamationsreaktion (Closa und Folch-Puy 2004). Auch für die chronische Herzinsuffizienz ist ein vermehrter oxidativer Stress beschrieben worden (Jekell et al. 2004). Es sind eine ganze Reihe von Enzymen bekannt, die unter Bedingungen des oxidativen Stress Veränderungen ihrer katalytischen Aktivität aufweisen (Nakashima et al. 2002). In unseren *ex vivo* Untersuchungen konnten wir zeigen, dass auch die sezernierte Sphingomyelinase in Gegenwart von AAPH, einem oxidativen Stimulus, ihre katalytische Aktivität verändert. Die Inkubation mit dem Radikalbildner führte zu einer massiven Zunahme der sphingolytischen Aktivität. Bis dahin war eine Steigerung der enzymatischen Hydrolyse durch eine oxidative Modifikation lediglich für das rekombinante Enzym beschrieben worden (Qui et al. 2003). Qui et. al. machten dabei die Veränderung an einem sogenannten „cysteine switch“ beziehungsweise eine Kupferionen induzierte Dimerisierung über eine Disulfidbrücke für den Anstieg der enzymatischen Aktivität verantwortlich. Unsere Ergebnisse bestätigen nun, dass der Mechanismus einer posttranslationalen Modifikation auch für die sezernierte Form der sauren Sphingomyelinase im menschlichen Plasma von Bedeutung sein könnte. Somit könnte neben einer erhöhten Proteinsekretion eine oxidative Modifikation des Enzyms durch vermehrten Anfall von Sauerstoffradikalen im Rahmen von akuten und chronischen Inflammationsvorgängen zu der beobachteten Steigerung der sphingolytischen Aktivität im Blut unserer Patientenkollektive beigetragen haben. Diese Vermutung wird überdies durch die beobachtete Korrelation zwischen der sSMPD1 Aktivität und den Harnsäurekonzentrationen bei unseren Patienten mit chronischer Herzinsuffizienz bekräftigt. Erhöhte Harnsäurespiegel

werden bei der Herzinsuffizienz unter anderem mit einer vermehrten Aktivität der Xanthinoxidase in Verbindung gebracht (Doehner et al. 2001b). Anstelle wie im Fall der Xanthindehydrogenase NAD als Elektronenakzeptor zu verwenden, überträgt dieses Enzym die freien Elektronen, die bei der Synthese von Harnsäure anfallen, direkt auf molekularen Sauerstoff. Hieraus resultiert ein vermehrter Anfall von reaktiven Sauerstoffspezies, insbesondere von unter physiologischen Bedingungen hochaktiven Superoxidradikalen. Auch die Harnsäure weist einen graduellen Anstieg mit steigendem Schweregrad der Herzinsuffizienz auf.

### 5.2.3. Ceramid und sSMPD1 Aktivität

Interessanterweise ist Ceramid, das Produkt der Sphingomyelinhydrolyse, dazu in der Lage die Bildung von reaktiven Sauerstoffspezies in Endothelzellen zu induzieren (Zhang et al. 2002). Über diesen Weg könnte Ceramid selbst zu einer Steigerung der sphingolytischen Aktivität führen und so seine eigene Bildung fördern. Darüber hinaus scheint es in die Regulierung der sSMPD1 Transkription involviert zu sein (Deigner et al. 2001). In Makrophagen, welche in Gegenwart von C6-Ceramid inkubiert wurden, wurde eine gesteigerte sSMPD1 Synthese beobachtet. Drobnik et al. haben von einer erhöhten Ceramid zu Sphingomyelin Ratio bei septischen Patienten berichtet (Drobnik et al. 2003). Während dieses veränderte Konzentrationsverhältnis selbst die Folge der von uns beobachteten erhöhten sSMPD1 Aktivität bei septischen Patienten sein könnte, könnte Ceramid zusätzlich zur Zytokin-vermittelten Enzymfreisetzung als Stimulus für eine transkriptionelle Steigerung der sSMPD1 Synthese fungieren. Ceramid könnte somit Teil eines sich selbst verstärkenden positiven Feedback-Mechanismus sein.

Welchen Anteil die Zytokin-vermittelte Enzymfreisetzung und welchen eine posttranslationale Modifikation von sSMPD1 an der beobachteten sphingolytischen Aktivitätssteigerung hat, lässt sich anhand der verwendeten Methodik nicht klären. Hierzu wären Messungen der absoluten Enzymkonzentration und des Grads der Dimerisierung notwendig. Ein hierzu erforderlicher Antikörper, der sich gegen die saure Isoform der Sphingomyelinase richtet, war bis zum Abschluss der Ergebnisaufnahme nicht kommerziell zu erwerben.

### 5.3. Mögliche Wirkungsweisen der sezernierten Sphingomyelinase

Bisher ist unklar, welche Bedeutung die Sekretion von sSMPD1 ins Blut im Rahmen einer systemischen Inflamationsreaktion für die Aktivierung des Sphingomyelinstoffwechsels hat. Gleichmaßen weiß man nur wenig über die genauen Auswirkungen einer erhöhten extrazellulären sphingolytischen Aktivität und dem damit verbundenen vermehrten Anfall an Sphingomyelinmetaboliten. Auf Grundlage unserer eigenen Ergebnisse und den Erkenntnissen anderer Arbeitsgruppen halten wir im Wesentlichen drei Wirkungsweisen für wahrscheinlich.

#### 5.3.1. Extrazellulärer Sphingomyelinstoffwechsel

Erstens ist es denkbar, dass die sezernierte Sphingomyelinase eine zentrale Rolle in der Initiierung eines extrazellulären Sphingolipidmetabolismus einnimmt. Durch die Untersuchungen zur Wirkung der sSMPD1 in der Pathogenese der Arteriosklerose ist bekannt, dass die von Endothelzellen in Richtung Gefäßwand freigesetzte sSMPD1 den Ceramidgehalt der dort anfallenden LDL steigert und so Retention und Aggregation der Lipoproteine fördert (Schissel et al. 1996a und 1998b).

Ähnlich der Wirkung auf gefäßwandständige Lipoproteine könnte die ins Blut sezernierte sSMPD1 auf den Ceramidgehalt der im Blut zirkulierenden Lipoproteine Einfluss nehmen. 63-75% des Plasma-Sphingomyelins sind in LDL und VLDL enthalten (Nilsson und Duan 2006). Bereits Drobnik et al. vermuteten, dass die von ihnen bei Sepsispatienten beobachtete erhöhte Ceramid/Sphingomyelin Ratio auf eine gesteigerte sSMPD1 Aktivität zurückgeht ohne allerdings die enzymatische Aktivität und deren Lokalisation direkt bestimmt zu haben (Drobnik et al. 2003). Unsere Ergebnisse weisen nun erstmals eine erhöhte sSMPD1 Aktivität im Plasma von septischen Patienten nach. Allerdings können wir keine Aussage über die Auswirkungen auf den Ceramidgehalt im Blut treffen. Dass sich eine erhöhte sSMPD1 Aktivität auf den Ceramidgehalt der im Blut enthaltenen Lipoproteine auswirken könnte, legen die Ergebnisse von Sathishkumar et al. nahe (Sathishkumar et al. 2005). Sie wiesen eine erhöhte sSMPD1 Aktivität bei Tumorpatienten nach einer Bestrahlung mit 15 Gy nach. Dieser Anstieg ging mit einer Steigerung des Ceramidgehalts der im Blut enthaltenen LDL einher. Einschränkend muss allerdings die geringe Fallzahl dieser Studie erwähnt werden. Zudem war eine Korrelation zwischen sSMPD1 Aktivität und Ceramidkonzentrationen nicht in jedem Fall eindeutig.

Darüber hinaus scheinen im Rahmen einer systemischen Inflammation aber auch andere Mechanismen an einer Steigerung des Ceramidgehalts im Blut mitzuwirken. Dies konnten Lightle et al. anhand eines *smpd1*  $-/-$  Modells zeigen (Lightle et al. 2003). Zwar war die basale Ceramidserumkonzentration in dem *Knockout*-Modell vermindert, was den Einfluss von SMPD1 auf den Ceramidgehalt im Blut unterstreicht. Dennoch stieg die Ceramidserumkonzentration nach Auslösung eines Endotoxinschocks an. Für diesen Anstieg konnte eine gesteigerte hepatische *de novo* Synthese von Ceramid verantwortlich gemacht werden. Über Lipoproteine gelangt das so gebildete Ceramid ins Blut. Somit ist denkbar, dass die von uns beobachtete erhöhte sSMPD1 Aktivität nicht alleinige Ursache für den von Drobnik et al. beobachteten Anstieg der Ceramidserumkonzentration bei septischen Patienten ist.

Verschiedene Untersuchungen zeigen die möglichen Folgen auf, die ein erhöhter, extrazellulärer Ceramidgehalt im Blut im Rahmen der systemischen Inflammationsreaktion haben könnte.

So ist Ceramid interessanterweise ein Ligand des Endotoxin Rezeptors CD14 und könnte so eine modulierende Wirkung auf die Immunzellfunktion nehmen (Pfeiffer et al. 2001).

Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass ein erhöhter Ceramidgehalt in LDL prinzipiell auch Einfluss auf die Homöostase des zellulären Ceramidgehalts von Endothelzellen in der Mikrozirkulation nehmen kann (Boyanovsky et al. 2003). Darüber hinaus steigert TNF- $\alpha$  speziell die Aufnahme von LDL mit erhöhtem Ceramidgehalt durch Endothelzellen. Der erhöhte Ceramidgehalt in den Endothelzellen wiederum sensibilisiert die Zellen für verschiedene apoptogene Signale, wie beispielsweise TNF- $\alpha$  (Sathishkumar et al. 2005). Dieser Zusammenhang gewinnt besondere Bedeutung im Rahmen der systemischen Inflammationsreaktion bei der sowohl der Ceramidserumgehalt als auch die TNF- $\alpha$  Spiegel erhöht sind. Bereits 1997 konnten Haimovitz-Friedmann et al. einen Zusammenhang herstellen zwischen erhöhten TNF- $\alpha$  Spiegeln, einer Aktivierung der sauren Sphingomyelinase mit der daraus folgenden, vermehrten Bildung des proapoptotischen Ceramids und einer disseminierten Endothelzellapoptose im Endotoxinschock (Haimovitz-Friedmann et al. 1997). In *smpd1*  $-/-$  Mäusen und Mäusen die mit einem TNF bindenden Protein vorbehandelt worden waren, blieb die Ceramidbildung nach Endotoxin Gabe aus. Die Mäuse zeigten eine verminderte Endothelzellapoptoserate und eine verbesserte Überlebensrate.



### 5.3.2. Wirkung nach Endozytose

Der zweite denkbare Weg, über welchen die ins Blut sezernierte sSMPD1 wirken könnte, ist eine direkte Beeinflussung des intrazellulären Sphingolipidmetabolismus mit einer zellgebundenen Ceramidsynthese im Sinne einer autokrinen oder parakrinen Wirkung nach Endozytose.

Die Inkubation von Zellkultursystemen mit exogener Sphingomyelinase ist ein weit verbreitetes *in vitro* Modell zur Untersuchung der Effekte einer intrazellulären Ceramidakkumulation. Dies ist Beleg dafür, dass eine extrazelluläre sphingolytische Aktivität den zellulären Ceramidgehalt auch direkt beeinflussen kann. Interessanterweise unterscheiden sich die verschiedenen Isoformen der Sphingomyelinase in ihrer Wirkung auf die inkubierten Zellkulturen (Garzia-Ruiz et al. 2000). Bei einem Vergleich der neutralen bakteriellen Sphingomyelinase und der human sauren Sphingomyelinase führte lediglich die saure Sphingomyelinase zu einer vermehrten Bildung von ROS und einer verstärkten Apoptoseneigung der inkubierten Hepatozyten. Die Steigerung des zellulären Ceramidgehalts im Falle der sauren Sphingomyelinase erfolgte dabei nach Endozytose und Translokation in das saure Zellkompartiment. Einen entsprechenden Wirkungsmechanismus hat Tabas auch für die saure, sezernierte sSMPD1 vorgeschlagen (Tabas 1999). Nach endozytotischer Wiederaufnahme würde die sezernierte Sphingomyelinase im Sinne einer autokrinen oder parakrinen Wirkung den intrazellulären Ceramidgehalt steigern. sSMPD1 könnte also auch auf diesem Weg Einfluss auf die Apoptoseneigung von Endothelzellen und der im Blut zirkulierenden Zellen nehmen. Somit könnten die von uns beobachteten erhöhten sSMPD1 Aktivitäten bei septischen Patienten auch teilweise den von Delogu et al. beschriebenen erhöhten Ceramidgehalt in zirkulierenden mononukleären Zellen von septischen Patienten bedingen (Delogu 1999). Allerdings ist hierfür auch eine unmittelbare Aktivierung der intrazellulären Isoformen der Sphingomyelinase ohne den Umweg über die sezernierte Isoform, sSMPD1, denkbar.

### 5.3.3. sSMPD1 und ceramidreiche Membranplattformen

Neben einer Steigerung des intrazellulären Ceramidpools nach Endozytose von sSMPD1 in die Zelle könnte die extrazelluläre sSMPD1 schließlich auch auf einem dritten Weg in den Sphingomyelinstoffwechsel der Zelle eingreifen. In diesem Zusammenhang stehen Untersuchungen, die eine weitere Sublokalisierung der sauren Sphingomyelinase nachweisen konnten. Nach einer Stimulation von Lymphozyten via CD95 beobachteten Grassme et al. die

Translokation einer sauren Sphingomyelinase aus einem intrazellulären Speicher auf die Außenseite der Zellmembran (Grassme et al. 2003a). Hier assoziiert sich die saure Sphingomyelinase mit sphingomyelinhaltigen *rafts*, setzt vermehrt Sphingomyelin zu Ceramid um und führt so zur Bildung von ceramidreichen Membranplattformen. Innerhalb dieser Membranplattformen kommt es zum Rezeptorclustering von CD95, was zu einer 100fachen Verstärkung der Signaltransduktion in die Zelle führt. Mittlerweile wird ein ähnlicher Mechanismus für eine Vielzahl von Mediatoren und Rezeptoren vermutet (Bollinger et al 2005). Hierzu zählen insbesondere Mediatoren und Rezeptoren, die in die Regulation von Inflammationsprozessen verwickelt sind, wie beispielsweise IL1 Rezeptor, PAF Rezeptor, CD14 und TNF- $\alpha$ . Interessanterweise scheint die Bildung von ceramidreichen Membranplattformen zudem eine wichtige Rolle bei der Infektionen verschiedener Zellformen mit bakteriellen, viralen und parasitären Erregern zu spielen (Gulbins et al. 2004). Erste Hinweise auf eine Beteiligung der sezernierten Sphingomyelinase an der Ausbildung der ceramidreichen Membranplattformen auf der Zellmembranaußenseite liefern die Beobachtungen von Göggel et al. (Göggel et al. 2004). Anhand eines Tiermodells untersuchten sie die Bedeutung der sauren Sphingomyelinase bei der Entwicklung des PAF-induzierten Lungenversagens. PAF gilt als einer der Hauptmediatoren in der Pathogenese des septischen Schocks und des Organversagens (Zimmermann et al 2002). Nach intravenöser Applikation von PAF beobachteten sie einen raschen Anstieg von sSMPD1 im Blut, begleitet von einem Anstieg des pulmonalen Ceramidgehalts und der Ausbildung eines akuten Lungenödems (Göggel et al. 2004). Sowohl in einem *smpd1*<sup>-/-</sup> Modell als auch nach Gabe von Antikörpern, die sich gegen das an der Zelloberfläche gebildete Ceramid richteten, war die Ausprägung des PAF induzierten Lungenödems vermindert. Auf Grundlage dieser Ergebnisse vermuteten Göggel et al., dass das auf der Membranoberfläche von Endothelzellen gebildete Ceramid an den Prozessen beteiligt ist, die zu einer erhöhten Gefäßpermeabilität und somit zum Lungenödem führten. Die Ceramidentstehung an der Zellmembranoberfläche könnte wiederum Folge der gleichzeitig erhöhten extrazellulären sSMPD1 Konzentrationen gewesen sein. Allerdings ist nicht auszuschließen, dass die Ceramidentstehung lediglich auf die direkte Translokation der sauren Sphingomyelinase in die Zellmembran zurückgeht und die erhöhten sSMPD1 Spiegel nur eine Begleiterscheinung sind.

Eine selektive Hemmung der sSMPD1 ist bisher nicht möglich. Verfügbare Hemmstoffe wirken auf der Ebene der Transkription oder des intrazellulären Abbaus der sauren Sphingomyelinase und betreffen somit alle drei Isoformen (Marchesini und Hannun 2004).

Somit lassen sich die möglichen Folgen einer erhöhten extrazellulären sSMPD1 Aktivität im Blut nicht eindeutig von Effekten der anderen SMPD1 Lokalisationsformen abgrenzen. Inwieweit die beschriebenen Veränderungen im Sphingomyelinstoffwechsel im Rahmen der systemischen Inflamationsreaktion also tatsächlich auf die Aktivität der sSMPD1 zurückgehen, lässt sich nicht abschließend beantworten (Abb. 21).

#### **5.4. Hemmung der SMPD1 – ein potenciales therapeutisches *Target* in der Behandlung des Organversagens bei SIRS und Sepsis?**

Apoptose ist vermutlich einer der Mechanismen, die im Rahmen einer akuten Inflamationsreaktion zur Organdysfunktion führen (Papathanassoglou et al. 2000). Wie beschrieben, gibt es eine ganze Reihe von Studien, die eine Aktivierung der SMPD1 und die darauf folgende Bildung des proapoptotischen Ceramids als einen entscheidenden Schritt in der Pathogenese des Organversagens postulieren (Delogu et al. 1999, Drobnik et al. 2003, Göggel et al. 2004). Wie mehrfach nachgewiesen, hat das *smpd1*<sup>-/-</sup> Modell einen entscheidenden Überlebensvorteil im Rahmen des Endotoxinschocks. Im Endotoxinschock führt die Apoptose von Endothelzellen zu einer Störung der Mikrozirkulation in den verschiedenen Organen und fördert so die Organdysfunktion. In der *smpd1*<sup>-/-</sup> Maus ist die Apoptoserate der Endothelzellen nach Endotoxin Gabe vermindert (Haimovitz-Friedmann et al. 1997). Das PAF-induzierte akute Lungenversagen als Folge einer gestörten Gefäßpermeabilität ist abgeschwächt (Göggel et al. 2004). Neben einer gestörten Endothelzellfunktion kann aber auch die Apoptose von parenchymatösen Gewebsanteilen direkt zur Dysfunktion eines Organs führen (Papathanassoglou et al. 2000). Auch hier scheint die Bildung von Ceramid eine Rolle zu spielen. So lösen beispielsweise eine Reihe von Mediatoren der akuten Phase Reaktion (Endotoxin, IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$ ) apoptotische Prozesse in der Leber aus, indem Sie die Bildung von Ceramid fördern. Garcia et al. beobachteten einen verminderten hepatozellulären Gewebsuntergang in der *smpd1*<sup>-/-</sup> Maus nach Endotoxin Gabe (Garcia-Ruiz et al. 2003). An diese Ergebnisse anknüpfend konnte unsere Arbeitsgruppe kürzlich zeigen, dass eine Reduktion der sSMPD1 Aktivität bei Mäusen im Endotoxinschock mit einer Verminderung der Apoptoserate in der Leber einhergeht (Claus et al. 2005). Durch Gabe eines Hemmstoffes der SMPD1 Synthese (NB6) ließ sich zunächst ein bleibender sSMPD1 Anstieg als Folge des Endotoxinschocks verhindern. Mittels eines speziellen histochemischen Verfahrens konnte dann in der Gruppe, die den Hemmstoff NB6 erhalten hatte, eine um 40% geringere Apoptoserate festgestellt werden.

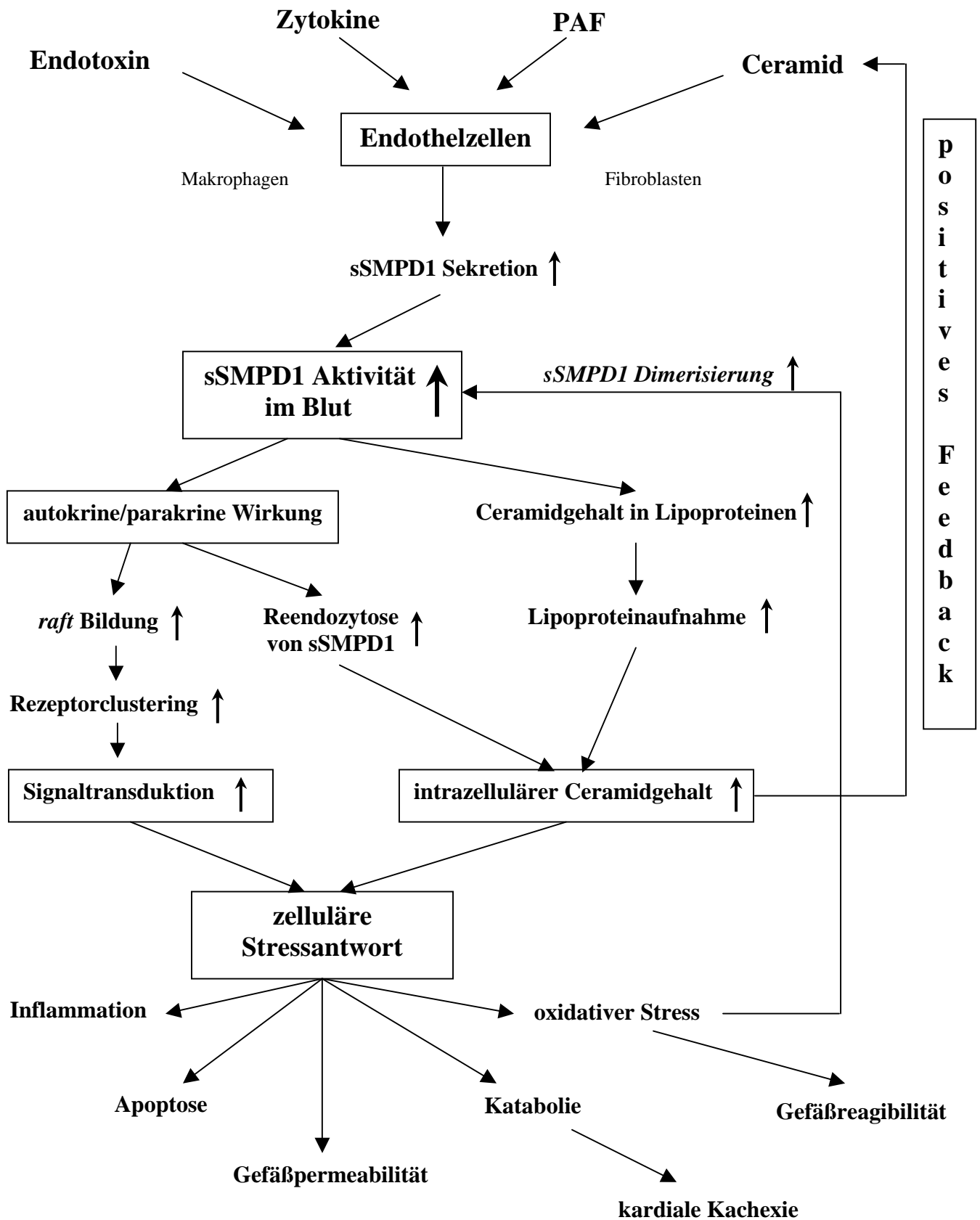


Abb. 21: Modell zur pathophysiologischen Bedeutung von sSMPD1 bei systemischer Inflammation

Abgesehen von einer möglichen Bedeutung in der Pathogenese der Organdysfunktion, könnte eine erhöhte sSMPD1 Aktivität ebenso in Veränderungen der Immunabwehr involviert sein. Eine gesteigerte Apoptoserate von Entzündungszellen kann bei Patienten mit Sepsis nachweislich zu einem Stadium der Immunsuppression führen (Hotchkiss und Karl 2003). Diese Immunsuppression erschwert zum einen die erfolgreiche Bekämpfung der zugrunde liegenden Infektion und macht den Patienten zum anderen empfänglicher für Sekundärinfektionen. Mittlerweile gibt es zahlreiche Hinweise dafür, dass eine Aktivierung des Sphingomyelinmetabolismus an der Entstehung der Immunsuppression bei septischen Patienten beteiligt sein könnte. Delogu et al. fanden signifikant erhöhte zelluläre Konzentration des Apoptoseinduktors Ceramid in mononukleären Zellen von septischen Patienten (Delogu et al. 1999). Die Ceramidkonzentration waren sogar noch höher bei Patienten, die im Verlauf ihrer Sepsis ein Multiorganversagen entwickelten. Eine andere Arbeit beschreibt, dass gramnegative Bakterien aber auch isoliertes Endotoxin die Apoptose von dendritischen Zellen über eine Aktivierung von SMPD1 induzieren können (Falcone et al. 2004). Dendritische Zellen spielen eine zentrale Rolle in der Koordinierung der Abwehr gegen eindringende Mikroorganismen. Auch die Apoptose von Lymphoblasten und Neutrophilen unter Bedingungen des oxidativen Stress konnte auf eine gesteigerte Aktivität der sauren Sphingomyelinase zurückgeführt werden (Komatsu et al. 2001, Scheel-Toellner et al. 2004). Unsere Ergebnisse zu einer direkten Aktivierung von sSMPD1 unter oxidativen Bedingungen beschreibt einen möglichen Mechanismus für diese Beobachtung.

Vordergründig erscheint eine Hemmung der sauren Sphingomyelinase also als ein vielversprechendes Therapieverfahren in der Behandlung des Organversagens und der Immunsuppression. Verschiedene Untersuchungen zur Bedeutung der sauren Sphingomyelinase bei der Infektabwehr zeigen allerdings auch, dass eine Hemmung der sauren Sphingomyelinase im Rahmen einer systemischen Infektion sogar negative Konsequenzen haben könnte (Grassme et al. 2003b). Grassme et al. konnten zeigen, welche essentielle Rolle die Aktivierung der sauren Sphingomyelinase und die hieraus resultierende Bildung von ceramidreichen Membranplattformen im Zusammenhang mit der Internalisierung eines Erregers und der darauffolgenden Apoptose der infizierten Zelle hat. Gleiches gilt für die Regulation der Zytokinfreisetzung durch die infizierte Zelle. Nach einer intranasalen Infektion mit *Pseudomonas aeruginosa* reagierten *smpd1*<sup>-/-</sup> Mäuse mit einer massiven Freisetzung von IL1- $\beta$ , einer gestörten Internalisierung des Erregers und einer verminderten Apoptoserate der infizierten Zellen. Diese Beobachtungen wurden von einer

ausgeprägten Übersterblichkeit der *smpd1*<sup>-/-</sup> Mäuse gegenüber den Wildtyptieren begleitet. Die *Knockout*-Mäuse waren nicht in der Lage, die pulmonale Infektion zu klären und verstarben im septischen Schock. Diese Ergebnisse unterstreichen, dass die isolierte Gabe von Endotoxin zur Auslösung eines Endotoxinschocks nur unzureichend die Pathomechanismen der Sepsis reproduzieren kann. Der Überlebensvorteil durch Hemmung der sauren Sphingomyelinase im Endotoxinschock (Haimovitz-Friedmann et al. 1997) kann sich also unter den Bedingungen einer realen Infektion in einen Nachteil verkehren.

### 5.5. sSMPD1 und ihr Einfluss auf Funktionsparameter der Herzinsuffizienz

Erste Hinweise auf eine mögliche Rolle des Sphingomyelinstoffwechsels in der Pathogenese der Herzinsuffizienz lieferten Untersuchungen, die zeigen konnten, dass Zytokine wie TNF- $\alpha$  ihre kardiodepressive Wirkung unter anderem über eine Aktivierung des Sphingomyelinstoffwechsels im Herzmuskel entfalten (Oral et al. 1997). Insbesondere für Sphingosin, einen direkten Metaboliten des Ceramids, konnte eine negativ chronotrope und negativ inotrope Wirkung nachgewiesen werden (Alewijense et al. 2004).

Bisher beschränkten sich die Untersuchungen zur kardialen Wirkung der Sphingomyelinmetabolite auf *in vitro* Versuche und Versuche im Tiermodell. Unsere Beobachtungen zeigen nun erstmalig, dass das Krankheitsbild der Herzinsuffizienz mit systemisch nachweisbaren Veränderungen im Sphingomyelinstoffwechsel einhergeht. Wie beschrieben, vermuten wir, dass der Anstieg der sSMPD1 aus dem chronischen Inflammationszustand der herzinsuffizienten Patienten resultiert und damit auf vergleichbare Mechanismen wie unter akuten Inflammationsbedingungen zurückgeht. Unklar ist, ob eine erhöhte sSMPD1 Aktivität sich ähnlich negativ auf die kardiale Pumpfunktion auswirken kann wie dies für die systemische Sphingosin und Sphingosin-1-Phosphat Gabe beobachtet wurde (Alewijense et al. 2004). Der Nachweis einer kardiodepressiven Wirkung hätte ebenfalls Auswirkungen auf das pathogenetische Verständnis der septischen Kardiomyopathie. Auch hier erscheint eine Aktivierung des Sphingomyelinstoffwechsels von Bedeutung (Favory et al. 2004).

Eine Korrelation zwischen Ejektionsfraktion, als Maß der kardialen Kontraktilität, und der sSMPD1 Aktivität fand sich im Falle unserer herzinsuffizienten Patienten allerdings nicht. Bisher waren die kardiodepressiven Wirkungen der Sphingomyelinmetabolite vorwiegend in Folge einer Aktivierung der neutralen Sphingomyelinase beschrieben worden (Oral et al. 1997). Im Fokus des Interesses standen die akuten Auswirkungen einer Aktivierung des

Sphingomyelinstoffwechsels für die Herzfunktion (Alewijnse et al. 2004). Im Fall der chronisch herzinsuffizienten Patienten ist davon auszugehen, dass die erhöhten sSMPD1 Aktivitäten im Blut bereits länger bestehen.

Bisher gibt es keine Erkenntnisse über die Auswirkungen von längerfristigen Veränderungen im Sphingomyelinstoffwechsel. Insofern lässt sich über mögliche kausale Zusammenhänge zwischen den beobachteten sSMPD1 Aktivitäten und den verschiedenen Funktionsparameter chronisch herzinsuffizienter Patienten nur spekulieren. Trotzdem sollen im Folgenden die beobachteten Veränderungen der sSMPD1 Aktivität bei herzinsuffizienten Patienten im Detail diskutiert werden.

Da sich eine signifikante Korrelation zwischen sSMPD1 und einer verminderten maximalen Sauerstoffaufnahme (Spitzen  $\text{VO}_2$ ) als Maß für eine eingeschränkte oxidativen Kapazität und individuelle Leistungsfähigkeit ergab, untersuchten wir insbesondere den statistischen Zusammenhang zwischen der sSMPD1 Aktivität und dem peripheren Blutfluss, der Gliedmaßenmuskelmasse sowie der muskulären Funktion. Ein eingeschränkter peripherer Blutfluss, der Verlust an Gliedmaßenmuskelmasse und eine gestörte Muskelfunktion sind wesentliche Faktoren in der Verminderung der oxidativen Kapazität und individuellen Leistungsfähigkeit chronisch herzinsuffizienter Patienten (Anker et al. 2004).

### **5.6. sSMPD1 und mögliche Auswirkungen auf die Vasomotorik**

Ein erhöhter peripherer Gefäßwiderstand und eine verminderte vasodilatative Kapazität sind Hauptmerkmale der chronischen Herzinsuffizienz (Harrington und Coats 1997). Eine Reihe von Studien hat gezeigt, dass erhöhte Zytokinspiegel im Plasma von Patienten mit chronischer Herzinsuffizienz eng mit einer Beeinträchtigung der peripheren Durchblutung vergesellschaftet sind (Anker et al. 1998). Dabei wurde beobachtet, dass  $\text{TNF-}\alpha$  zu einer Hemmung der induzierbaren Endothelzell-abhängigen Vasorelaxation führt. In einer Reihe von *in vivo* Versuchen konnte durch Gabe des rekombinanten  $\text{TNF-}\alpha$  Rezeptors Etanercept die Gefäßreagibilität und Belastbarkeit von herzinsuffiziente Patienten erheblich verbessert werden (Fischlscherer et al. 2001). Um die Gefäßreagibilität entsprechend beurteilen zu können, bediente man sich hierbei, ebenso wie in unseren Untersuchungen, Messungen zur Durchblutung am Unterarm.

Unsere Untersuchungen, die eine Korrelation zwischen sSMPD1 Aktivität und beeinträchtigter vasodilatativer Kapazität nachweisen konnten, lassen nun vermuten, dass die sezernierte Variante der saure Sphingomyelinase zumindest teilweise an den beobachteten

Zytokineffekten auf die Vasomotorik beteiligt sein könnte. Die Beobachtungen von Zang et al. liefern einen möglichen Mechanismus, der diesem Zusammenhang zugrunde liegen könnte (Zhang et al. 2002). Ihnen gelang es nachzuweisen, dass der hemmende Effekt von TNF- $\alpha$  auf die Vasomotorik von Koronararterien an eine gesteigerte Aktivität der sauren Sphingomyelinase gebunden ist. Desipramin, ein potenter Inhibitor der sauren Sphingomyelinase, der zudem mit der Enzym-Membran Interaktion interferiert (Kolzer et al. 2004), vermochte die TNF- $\alpha$  Wirkung nahezu vollständig aufzuheben. Weiterführende Untersuchung machten schließlich eine vermehrte Bildung von Superoxidanionen als Folge der erhöhten Ceramidkonzentrationen und die konsekutive NO Depletion für die beobachteten Effekte auf die Vasomotorik verantwortlich.

Die sezernierte Sphingomyelinase könnte somit in die Entstehung der Endotheldysfunktion und der sich daraus ergebenden gestörten Gefäßreagibilität als eines der Hauptmerkmale der chronischer Herzinsuffizienz involviert sein.

Dagegen scheint die endotheliale Dysfunktion im Rahmen der arteriellen Hypertonie weniger stark vom Sphingomyelinstoffwechsel beeinflusst zu sein. Die sSMPD1 Aktivität wies keinen signifikanten Unterschied zwischen der normotensiven und hypertensiven Kontrollgruppe auf. Vorausgegangene Untersuchungen haben zeigen können, dass die modulierende Wirkung der Sphingomyelinmetabolite auf den Gefäßtonus unter verschiedenen Bedingungen unterschiedlich ausfallen kann (Alewijense et al. 2004). Ob einzelne Sphingomyelinmetabolite eine Vasokonstriktion im Rahmen der arteriellen Hypertonie begünstigen, ist zurzeit noch unklar. Bisher existieren zu diesem Thema lediglich einige Untersuchungen an sogenannten spontan-hypertensiven Ratten mit teils widersprüchlichen Ergebnissen. Kürzlich konnten Ryu et. al. eine gesteigerte Vasokonstriktion in mesenterialen Gefäßen von spontan-hypertensiven Ratten in Antwort auf eine Sphingosylphosphorylcholinexposition beobachten (Ryu et al. 2006). Andere Arbeitsgruppen machten gegenteilige Beobachtungen, die auf eine Beeinträchtigung des Ceramidsignalweges in spontan-hypertensiven Ratten hinweisen und eine reduzierte vasokonstriktive Wirkung verschiedener Sphingomyelinmetabolite wie Sphingosin-1-Phosphat, Sphingosylphosphorylcholin und Ceramid zeigten (Altmann et al. 2003). Als mögliche Ursache wird eine veränderte Rezeptorausstattung bei spontan-hypertensiven Ratten diskutiert (Alewijense et al. 2004).



### 5.7. Erhöhte sSMPD1 Aktivität bei kardialer Kachexie

Bei einer Subgruppenanalyse stellte sich heraus, dass die Gruppe der herzinsuffizienten Patienten mit begleitender kardialer Kachexie gegenüber der Kontrollgruppe und den Patienten ohne diesen komplizierenden Phänotyp eine signifikant erhöhte sSMPD1 Aktivität aufwiesen. Bei der kardialen Kachexie handelt es sich um ein Symptom der fortgeschrittenen Herzinsuffizienz, welches die weitere Prognose eines Patienten wesentlich verschlechtert (Anker et al. 2004). Herzinsuffiziente Patienten mit kardialer Kachexie sind weniger belastbar und ermüden schneller, was sowohl auf eine verminderte Muskelmasse als auch auf eine gestörte Muskelfunktion zurückgeführt wird. Auch wenn die kardiale Kachexie durch einen allgemeinen Verlust an Fettgewebsmasse, fettgewebstreier Körpermasse und Knochengewebe gekennzeichnet ist, stellt der Verlust der Muskelmasse ein sehr frühes Ereignis im Prozess des allgemeinen körperlichen Schwundes dar und beginnt bereits lange bevor die eigentliche Diagnose einer kardialen Kachexie gestellt wird (Anker et al. 1999). Neben anderen pathophysiologischen Veränderungen, die an der Entstehung der Kachexie beteiligt sein könnten, werden insbesondere Zytokine wie TNF- $\alpha$  als wesentliche Mediatoren in der Pathogenese des Gewichtsverlusts und des körperlichen Schwundes gesehen (Cicoira et al. 2001). Erhöhte TNF- $\alpha$  Plasmaspiegel, die sich auch bei unseren kachektischen Patienten fanden, könnten eine der Ursachen für die gesteigerte sSMPD1 Aktivität bei der Kachexie darstellen. Auch die bekanntermaßen erhöhte Aktivität der Xanthinoxidase bei kachektischen Patienten (Doehner et al. 2001b) könnte aus genannten Gründen zum Anstieg der sphingolytischen Aktivität beitragen. Hierfür sprechen die positiven Korrelationen zwischen sSMPD1 auf der einen und TNF- $\alpha$  sowie Harnsäure auf der anderen Seite.

### 5.8. sSMPD1 und die fettgewebstreie Körpermasse

Entsprechend der erhöhten sphingolytischen Aktivität bei den Patienten mit kardialer Kachexie fand sich für die gesamte Gruppe der herzinsuffizienten Patienten eine negative Korrelation zwischen sSMPD1 Aktivität und globalen Parametern der körperlichen Konstitution wie Gewicht und *body mass index*. Bei detaillierter Betrachtung bestätigte sich ein statistisch signifikanter Zusammenhang allerdings lediglich zwischen sSMPD1 Aktivität und verminderter fettgewebstreier Masse (sowohl bei Betrachtung der totalen Masse wie auch der regionalen Verteilung). Ein Zusammenhang zwischen Fettgewebsmasse und sSMPD1 Aktivität ließ sich in diesem Patientenkollektiv nicht herstellen. Fettgewebstreie Körpermasse setzt sich vor allem aus Muskelmasse zusammen. Ein Zusammenhang zwischen erhöhter

sSMPD1 Aktivität und reduzierter fettgewebefreier Körpermasse ist somit möglicherweise vor dem Hintergrund von Beobachtungen zu sehen, die eine Beteiligung von Ceramid an der Steuerung des muskulären Energiestoffwechsel nachweisen konnten (Hyde et al. 2005, Strackowski et al. 2004, Strle et al. 2004). Verschiedene *in-vitro* und *in-vivo* Untersuchungen haben zeigen können, dass Ceramid, in Form von Zellmembran-gängigen Analoga oder nach vermehrter TNF- $\alpha$  induzierter Bildung aus Sphingomyelin die Glukoseaufnahme und Speicherung im Skelettmuskel beeinträchtigt (Strackowski et al. 2004). Zudem konnten Hyde et al. zeigen, dass Ceramid die Proteinsynthese und den Aminosäuretransport im Skelettmuskel nachteilig beeinflusst (Hyde et al. 2005). Als Antwort auf eine Ceramidexposition ließ sich eine Reduktion des totalen intrazellulären Aminosäurepools beobachten, woraufhin intrazelluläre Sensoren Signale über ein Aminosäuremangelsituation aussendeten. Dies geschah unabhängig von der tatsächlichen extrazellulären Verfügbarkeit von Aminosäuren und resultierte in einer herabgesetzten Proteinsynthese des Muskelgewebes.

Ferner konnte kürzlich gezeigt werden, dass Ceramid ein zentraler *second messenger* in der Beeinträchtigung der Muskelproteinsynthese durch Zytokine darstellt (Strle et al. 2004). So scheint Ceramid an einer Blockade der Signaltransduktion des IGF-1 Rezeptors unmittelbar beteiligt zu sein. Gleichzeitig existieren Berichte über eine Wachstumshormonresistenz bei herzinsuffizienten Patienten (Anker et al. 2001). Diese Wachstumshormonresistenz wird als wichtiger Faktor in der Entstehung des metabolischen Ungleichgewichts gesehen, das letztlich in der kardialen Kachexie mündet (Anker et al. 1997a). Vor diesem Hintergrund lassen unseren Ergebnisse einer gesteigerten sSMPD1 Aktivität bei Patienten mit kardialer Kachexie und einer Korrelation zwischen sSMPD1 Aktivität und reduzierter fettgewebefreier Körpermasse einen direkten Zusammenhang vermuten.

### 5.9. sSMPD1 und Muskelfunktion

Vor dem Hintergrund einer Ceramidwirkung mit Beeinträchtigung der Glukoseaufnahme und katabolen Effekten im Proteinstoffwechsel der Skelettmuskulatur stellte sich uns die Frage, ob eine erhöhte sSMPD1 Aktivität auch mit einer gestörten Muskelfunktion bei Patienten mit chronischer Herzinsuffizienz einhergehen würde. Interessanterweise fand sich eine starke Korrelation zwischen eingeschränkter Muskelleistung und sSMPD1 Aktivität. Nicht nur die totale isometrische Muskelkraft sondern insbesondere die für eine verringerte Muskelmasse korrigierte Muskelkraft pro Zentimeter Muskelquerschnitt – Maß der funktionellen Muskelqualität – wies einen statistischen Zusammenhang mit den sSMPD1 Serumaktivitäten auf.

Basierend auf unseren eigenen Beobachtungen und den Ergebnisse anderer Arbeitsgruppen scheint der Ceramidsignalweg somit eine wichtige Rolle in der Regulation struktureller als auch funktioneller Aspekte des Muskelgewebes einzunehmen. Die Korrelation zwischen sSMPD1 auf der einen und reduzierter Muskelmasse sowie eingeschränkter Muskelfunktion auf der anderen Seite lassen vermuten, dass die sezernierte Sphingomyelinase möglicherweise als Aktivator in diesen Signaltransduktionsweg eingebunden ist. Da es sich für den Körper beim Skelettmuskel um den Hauptspeicherort für gebundene und freie Aminosäuren handelt (Hyde et al. 2005), könnten die Effekte des Ceramids auf den muskulären Metabolismus Auswirkungen auf die Protein- und Energieversorgung des gesamten Organismus haben. Somit wäre denkbar, dass der beobachtete Anstieg der sSMPD1 Aktivität ein wichtiger Faktor in der Pathogenese der kardialen Kachexie darstellt. Im Rahmen der chronischen Herzinsuffizienz wäre die sezernierte Sphingomyelinase also mögliches Bindeglied zwischen Immunaktivierung und körperlichem Schwund.

## 6. Schlussfolgerungen

Unsere Ergebnisse zeigen, dass sowohl akute als auch chronische systemische Inflammationszustände mit einem Anstieg der sphingolytischen Aktivität im Blut einhergehen. Verantwortlich hierfür ist eine gesteigerte Aktivität der sezernierten Sphingomyelinase sSMPD1, die am ehesten Folge einer verstärkten Zytokin-induzierten Sekretion aus dem Endothel oder auch Resultat einer Enzymmodifikation unter oxidativen Bedingungen ist. Welchen Anteil diese zwei Mechanismen am beobachteten Anstieg der sphingolytischen Aktivität tatsächlich haben, lässt sich anhand unserer Methode nicht differenzieren. Hierzu wäre eine Bestimmung der absoluten Enzymmenge und des Dimerisierungsgrad erforderlich.

Als ein ins Blut sezerniertes Enzym, welches den ersten Schritt im Abbau des Sphingomyelins katalysiert, trägt die sezernierte Sphingomyelinase vermutlich entscheidend zur systemischen Aktivierung des Sphingomyelinsignalweges im Rahmen von generalisierten Inflammationsreaktionen bei. Die erhöhten sSMPD1 Aktivitäten könnten somit als Indikator einer Systemreaktion auf der Ebene des Sphingomyelinstoffwechsels interpretiert werden.

Über welche Wege die sezernierte Sphingomyelinase Einfluss auf den systemischen Sphingomyelinmetabolismus nimmt ist bisher noch unklar. Durch die extrazelluläre Lokalisation ist sowohl eine Einflussnahme auf den in Lipoproteinen enthaltenen Sphingomyelinpool als auch eine Wechselwirkung mit dem zu 85% in der äußeren Lipidschicht von Zellmembranen lokalisierten Sphingomyelin denkbar. Die sezernierte Sphingomyelinase könnte somit auf unterschiedlichen Wegen zu einer Steigerung des intrazellulären Ceramidgehalts in verschiedenen Zelltypen führen und diese so gegenüber apoptogenen Signalen sensibilisieren. Eine erhöhte sphingolytische Aktivität im Rahmen einer systemischen Inflammationsreaktion könnte somit an der Ausbildung von endothelialer Dysfunktion, Immunsuppression und Organversagen beteiligt sein.

Sowohl im Falle der akuten Entzündungsreaktionen als auch der chronischen Herzinsuffizienz scheint ein unmittelbarer Zusammenhang zwischen sSMPD1 Aktivität und der Schwere des jeweiligen Krankheitsbildes zu bestehen. Ob es sich hierbei lediglich um ein Epiphänomen handelt oder ein kausaler Zusammenhang zwischen sSMPD1 Aktivität und Krankheitsschwere besteht, lässt sich abschließend nicht beantworten. Gleiches trifft für die beobachteten Korrelationen zwischen sSMPD1 Aktivität auf der einen und Gefäßreagibilität, Konstitution und Muskelleistung auf der anderen Seite zu. Ebenso wenig lassen sich die Ergebnisse zur sSMPD1 Aktivität bei akuter mit denen bei chronischer Inflammationsreaktion

direkt vergleichen. Adaptationsvorgänge im Rahmen des chronischen Entzündungsgeschehens könnten die Auswirkungen einer erhöhten sSMPD1 Aktivität abmildern. Vorstellbar ist auch eine permissive Wirkungsweise, bei der einer erhöhten sSMPD1 Aktivität bei den unterschiedlichen Krankheitsbildern und in Gegenwart eines andersartigen Reaktionsmileaus ein völlig andere Bedeutung zukommt.

Der Sphingomyelinstoffwechsel zeichnet sich durch einen hohen Vernetzungsgrad aus. Daher sind weitere Untersuchungen erforderlich, um eine Aussage über die exakte Zusammensetzung der unter den jeweiligen Bedingungen akkumulierenden Sphingolipide treffen zu können. Hierzu bedarf es auch der Analyse weiterer am Sphingomyelinstoffwechsel beteiligter Enzyme, die ebenfalls durch Zytokine reguliert werden. Bisher existieren keine Berichte, die darauf hinweisen, dass neben sSMPD1 andere Enzyme des Sphingomyelinstoffwechsels in vergleichbar relevanter Menge ins Blut sezerniert werden. Ob letztlich Ceramid oder andere verwandte Sphingolipide wie Sphingosin oder Sphingosin-1-Phosphat überwiegen und das klinische Bild dominieren, mag je nach der lokalen Enzymausstattung somit von Gewebe zu Gewebe unterschiedlich sein. Die Tatsache, dass selbst auf subzellulärer Ebene die Enzymexpression variieren kann, wird derartige Untersuchungen zusätzlich erschweren.

Vor dem Hintergrund der funktionellen Diversität der einzelnen Sphingomyelinderivate ist eine genaue Analyse der akkumulierenden Sphingomyelinderivate allerdings entscheidend. Nur so wird man klären können, welche pathophysiologische Bedeutung die einzelnen Metabolite im Rahmen der akuten systemischen Inflamationsreaktionen und der chronischen Herzinsuffizienz besitzen.

Weitere tierexperimentelle Untersuchungen werden zeigen müssen, ob eine Inhibition der sezernierten Sphingomyelinase ein mögliches therapeutisches *target* in der Behandlung dieser Krankheitsbilder darstellt.

## 7. Literaturverzeichnis

- Alewijnse AE, Peters SLM, Michel MC. 2004 Cardiovascular effects of sphingosine-1-phosphate and other sphingomyelin metabolites. *Br J Pharmacol*, 143: 666–684.
- Altmann C, Fetscher C, Boyukbas D, Michel MC. 2003. Effects of sphingosine-1-phosphate, sphingosyl-phosphorylcholine and ceramide in mesenteric artery contraction and relaxation in spontaneously hypertensive rat. *Br J Pharmacol*, 138 (Suppl): 157
- Angus DC, Linde-Zwible WT, Lidicker J, Clermont G, Carillo J, Pinsky MR. 2001. Epidemiology of severe sepsis in the United States: Analysis of incidence, outcome, and associated costs of care. *Crit Care Med*, 29: 1303-1310
- Anker SD, Chua TP, Ponikowski P, Harrington D, Swan JW, Kox WJ, Poole-Wilson PA, Coats AJ. 1997a. Hormonal changes and catabolic/anabolic imbalance in chronic heart failure and their importance for cardiac cachexia. *Circulation*, 96: 526-534
- Anker SD, Swan JW, Volterrani M, Chua TP, Clark AL Poole-Wilson PA, Coats AJ. 1997b. The influence of muscle mass, strength, fatigability and blood flow on exercise capacity in cachectic and non-cachectic patients with chronic heart failure. *Eur Heart J*, 18: 259-269
- Anker SD, Volterrani M, Egerer KR, Felton CV, Kox WJ, Poole-Wilson PA, Coats AJ. 1998. Tumour necrosis factor alpha as a predictor of impaired peak leg blood flow in patients with chronic heart failure. *QJM*, 91: 199-203
- Anker SD, Ponikowski PP, Clark AL, Leyva F, Rauchhaus M, Kemp M, Teixeira MM, Hellewell PG, Hooper J, Poole-Wilson PA, Coats AJ. 1999. Cytokines and neurohormones relating to body composition alterations in the wasting syndrome of chronic heart failure. *Eur Heart J*, 20: 683-693
- Anker SD, Volterrani M, Pflaum CD, Strasburger CJ, Osterziel KJ, Doehner W, Ranke MB, Poole-Wilson PA, Giustina A, Dietz R, Coats AJ. 2001. Acquired growth hormone resistance in patients with chronic heart failure: implications for therapy with growth hormone. *J Am Coll Cardiol*, 38: 443-452
- Anker SD, Doehner W, Rauchhaus M, Sharma R, Francis D, Knosalla C, Davos CH, Ciccoira M, Shamim W, Kemp M, Segal R, Osterziel KJ, Leyva F, Hetzer R, Ponikowski P, Coats AJ. 2003. Uric acid and survival in chronic heart failure: validation and application in metabolic, functional, and hemodynamic staging. *Circulation*, 107:1991-1997.
- Anker SD, Steinborn W, Strassburg S. 2004. Cardiac cachexia. *Ann Med*, 36: 518-529
- Aukrust P, Ueland T, Lien E, Bendtzen K, Müller F, Andreassen AK et al. 1999. Cytokine network in congestive heart failure secondary to ischemic or idiopathic dilated cardiomyopathy. *Am J Cardiol*, 83: 376-382
- Baumruker T, Prieschl EE. 2002. Sphingolipids and the regulation of immune response. *Seminars in Immunology*, 14: 57-63.
- Bligh EG, Dyer WJ. 1959. *Can J Biochem Physiol* 37: 911-917
- Bloos F, Reinhart K. 2002. Neue Therapieansätze bei Sepsis. *Zentralbl Chir*, 127(3): 174-179

- Bollinger CR, Teichgräber V, Gulbins E. 2005. Ceramide-enriched membrane domains. *Biochemica et Biophysica Acta* 1746: 284-294
- Bone RC, Balk RA, Cerra FB, Dellinger RP, Fein AM, Knaus WA, Schein RMH, Sibbald WJ. 1992. American College of Chest Physicians/Society of Critical Care Medicine Consensus Conference: definition for sepsis and organ failure and guidelines for the use of innovative therapies in sepsis. *Crit Care Med*, 20: 864-874
- Bone RC, Grodzin CJ, Balk RA. 1997. Sepsis: A new Hypothesis for pathogenesis of the disease process. *Chest*. July; 112:235-243.
- Boyanovsky B, Karakashian A, King K, Giltaiy N, Nikolova-Karakashian M. 2003. Uptake and Metabolism of Low Density Lipoproteins with Elevated Ceramide Content by Human Microvascular Endothelial Cells. Implications for the regulation of apoptosis. *J Biol Chem*, 278(29): 26992–26999
- Brunkhorst FM, Karzai W, Reinhart K. 2002. Aktuelle Aspekte der Sepsisdiagnose. *Zentralbl Chir*, 127(3): 165-173
- Brunkhorst FM. 2004 Definition und Diagnose der Sepsis nach aktuellen Kriterien. *Klinikerzt*, 33(6): 167-172
- Brunkhorst FM. 2006. Epidemiologie, Ökonomie und Praxis - Ergebnisse der deutschen Prävalenzstudie des Kompetenznetzwerkes Sepsis (SepNet)\*. *Anästhesiol Intensivmed Notfallmed Schmerzther*, 41: 43-44
- Cain BS, Meldrum DR, Dinarello CA, Meng X, Joo KS, Banerjee A, Harken AH. 1999. Tumor necrosis factor-alpha and interleukin-1beta synergistically depress human myocardial function. *Crit Care Med*, 27(7): 1309-1318
- Callahan JW, Jones CS, Davidson DJ, Shankaran P. 1983. The active site of lysosomal sphingomyelinase: evidence for the involvement of hydrophobic and ionic groups. *J Neurosci Res*, 10: 151–163
- Cicoira M, Bolger AP, Doehner W, Rauchhaus M, Davos C, Sharma R, Al-Nasser FO, Coats AJ, Anker SD. 2001. High tumour necrosis factor-alpha levels are associated with exercise intolerance and neurohormonal activation in chronic heart failure patients. *Cytokine*, 15(2): 80-86
- Claus RA, Bunck AC, Bockmeyer CL, Brunkhorst FM, Loesche W, Kinscherf R, Deigner HP. 2005. Role of increased sphingomyelinase activity in apoptosis and organ failure of patients with sepsis. *FASEB J*, 19: 1719-1721
- Closa D, Folch-Puy E. 2004. Oxygen free radicals and the systemic inflammatory response. *IUBMB Life*, 56: 185-191.
- Cohen J. 2002. The immunopathogenesis of sepsis. *Nature*, Dec; 420: 885-891
- Cremesti AE, Goni FM, Kolesnick R. 2002. Minireview: Role of sphingomyelinase and ceramide in modulating rafts: do biophysical properties determine biologic outcome? *FEBS Letters*, 531: 47-53

- Deigner HP, Claus R, Bonaterra GA, Gehrke C, Bibak N, Blaess M, Cantz M, Metz J, Kinscherf R. 2001. Ceramide induces aSMase expression: implications for oxLDL-induced apoptosis. *FASEB J*, 15: 807–814
- Delogu G, Famularo G, Amati F, Signore L, Antonucci A, Trinchieri V, Di Marzio L, Cifone MG. 1999. Ceramide concentrations in septic patients: a possible marker of multiple organ dysfunction syndrome. *Crit Care Med*, 27: 2413–2417
- Dobrowsky RT, Gazula VR. 2000. Analysis of sphingomyelin hydrolysis in caveolar membranes; in: *Methods in Enzymology*, volume 311: Sphingolipid metabolism and cell signaling, Part A. herausgegeben von Merrill AH Jr. und Hannun YA, Academic press, San Diego (2000): 184-193.
- Doehner W, Pflaum CD, Rauchhaus M, Godsland IF, Egerer K, Florea VG, Sharma R, Bolger AP, Coats AJS, Anker SD, Strasburger CJ. 2001a. Leptin, insulin sensitivity and growth hormone binding protein in chronic heart failure with and without cardiac cachexia. *Eur J Endocrin*, 45: 727-735
- Doehner W, Rauchhaus M, Florea VG, Sharma R, Bolger AP, Davos CH, Coats AJS, Anker SD. 2001b. Uric acid in cachectic and noncachectic patients with chronic heart failure: Relationship to leg vascular resistance. *Am Heart J*, 141:792-9
- Drobnik W, Liebisch G, Audebert FX, Frohlich D, Gluck T, Vogel P, Rothe G, Schmitz G. 2003. Plasma ceramide and lysophosphatidylcholine inversely correlate with mortality in sepsis patients. *J Lipid Res*, 44: 754–761
- Falcone S, Perrotta C, de Palma C, Pisconti A, Sciorati C, Capobianco A, Rovere-Querini P, Manfredi AA, Clementi E. 2004. Activation of acid sphingomyelinase and its inhibition by the nitric oxide/cyclic guanosine 3',5'-Monophosphate pathway: key events in escherichia coli-elicited apoptosis of dendritic cells. *J Immunol*, 173: 4452-4463
- Favory R, Lancel S, Marchetti P, Mordon S, Chopin C, Formstecher P, Neviere R. 2004. Endotoxin-induced myocardial dysfunction: Evidence for a role of sphingosine production. *Crit Care Med*, 32(2): 495-501
- Fichtlscherer S, Rossig L, Breuer S, Vasa M, Dimmeler S, Zeiher AM. 2001. Tumor necrosis factor antagonism with etanercept improves systemic endothelial vasoreactivity in patients with advanced heart failure. *Circulation*, 104: 3023-3025
- Futerman AH, Hannun YA. 2004. The complex life of simple sphingolipids. *EMBO reports*, 5(8): 777-782
- Gabay C, Kushner I. 1999. Acute-phase proteins and other systemic responses to inflammation. *N Engl J Med*, 340: 448-454
- Garcia-Ruiz C, Mari M, Morales A, Colell A, Ardite E, Fernandez-Checa JC. 2000. Human placenta sphingomyelinase, an exogenous acidic pH-Optimum sphingomyelinase, induces oxidative stress, glutathione depletion, and apoptosis in rat hepatocytes. *Hepatology*, 32: 56-65



- Garcia-Ruiz C, Colell A, Mari M, Morales A, Calvo M, Enrich C, Fernandez-Checa JC. 2003. Defective TNF- $\alpha$ -mediated hepato-cellular apoptosis and liver damage in acidic sphingomyelinase knockout mice. *J Clin Invest*, 111: 197–208
- Genth-Zotz S, von Haehling S, Bolger AP, Kalra PR, Coats AJS, Anker SD. 2002. Pathophysiological quantities of Endotoxin induce tumor necrosis factor release in whole blood from patients with chronic heart failure. *Am. J. Cardiol*, 90:1226-30
- Göggel R, Winoto-Morbach S, Vielhaber G, Imai Y, Lindner K, Brade L, Brade H, Ehlers S, Slutsky AS, Schütze S, Gulbins E, Uhlig S. 2004. PAF-mediated pulmonary edema: a new role for acid sphingomyelinase and ceramide. *Nat Med*, 10:155-160
- Goni FM, Alonso A. 2002. Minireview. Sphingomyelinases: enzymology and membrane activity. *FEBS Letters*, 531: 38-46
- Gorska M, Baranczuk E, Dobrzyn A. 2003. Secretory Zn<sup>2+</sup>-dependent sphingomyelinase activity in the serum of patients with type 2 diabetes is elevated. *Horm Metab Res*, 35: 506–507
- Grassme H, Cremasti A, Kolesnick R, Gulbins E. 2003a. Ceramide-mediated clustering is required for CD95-DISC formation. *Oncogene*, 22(35): 5457-5470
- Grassme H, Jendrossek V, Riehle A, von Kürthy G, Berger J, Schwarz H, Weller M, Kolesnick R, Gulbins E. 2003b. Host defense against *Pseudomonas aeruginosa* requires ceramide-rich membrane rafts. *Nat Med* 9(3): 322-330
- Gulbins E, Kolesnick R. 2002. Acid sphingomyelinase-derived ceramide signaling in apoptosis. *Subcellular Biochem*, 36: 229-244
- Gulbins E, Kolesnick R. 2003. Raft ceramide in molecular medicine. *Oncogene* 22: 7070-7077
- Gulbins E, Dreschers S, Wilker B, Grassme H. 2004. Ceramide, membrane rafts and infections. *J Mol Med*, 82: 357–363
- von Haehling S, Jankowska EA, Anker SD. 2004. Tumor necrosis factor- $\alpha$  and the failing heart. Pathophysiology and therapeutic implications. *Basic Res Cardiol*, 99: 18-28
- Haimovitz-Friedman A, Cordon-Cardo C, Bayoumy S, Garzotto M, McLoughlin M, Gallily R, Edwards CK, Schuchman EH, Fuks Z, Kolesnick R. 1997. Lipopolysaccharide induces disseminated endothelial apoptosis requiring ceramide generation. *J Exp Med*, 186: 1831–1841
- Hannun YA, Luberto C, Argraves KM. 2001. Enzymes of sphingolipid metabolism: from modular to integrative signaling. *Biochemistry*, 40: 4893-4903
- Harrington D, Coats AJ. 1997. Mechanisms of exercise intolerance in congestive heart failure. *Curr Opin Cardiol*, 12: 224–232
- Hotchkiss RS, Swanson P, Freeman B, Tinsley KW, Cobb JP, Matuschak G, Buchman TG, Karl IE. 1999. Apoptotic cell death in patients with sepsis, shock and multiple organ dysfunction. *Crit Care Med*, 27(7): 1230-1251

- Hotchkiss RS, Karl IE. 2003. The pathophysiology and treatment of sepsis. *N Engl J Med*, 348: 138–150
- Hyde R, Hajduch E, Powell DJ, Taylor PM, Hundal HS. 2005. Ceramide down-regulates System A amino acid transport and protein synthesis in rat skeletal muscle cells. *FASEB J*, 19: 461-484
- Jekell A, Hossain A, Alehagen U, Dahlström U, Rosen A. 2004. Elevated circulating levels of thioredoxin and stress in chronic heart failure. *Eur J Heart Fail*, 6(7): 883-890
- Jones DA, Round JM, Edwards RHT, Grindrod SR, Tofts PS. 1983. Size and composition of the calf and quadriceps in Duchenne muscular dystrophy. *J Neurol Sci*, 60: 307-322
- Karimova A, Pinsky DJ. 2001. The endothelial response to oxygen deprivation: biology and clinical implications. *Intensive Care Med*, 27:19-31
- Knaus WA, Draper EA, Wagner DP, Zimmermann JE. 1985. APACHE II: a severity of disease classification system. *Crit Care Med* 13(10): 818-829
- Koch T, Funk RHW. 2001. Zelluläre Dysfunktion in der Pathogenese des Organversagens. *Anaesthesist*, 50:742-749
- Kolzer M, Werth N, Sandhoff K. 2004. Interactions of acid sphingomyelinase and lipid bilayers in the presence of the tricyclic antidepressant desipramine. *FEBS Letters*, 559: 96-98
- Komatsu M, Takahashi T, Abe T, Takahashi I, Ida H, Takada G. 2001. Evidence for the association of ultraviolet-C and H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-induced apoptosis with acid sphingomyelinase activation. *Mol Cell Biol Lipids*, 1533(1): 47-54.
- Krishnagopalan S, Kumar AS, Parillo JE, Kumar AN. 2002. Myocardial dysfunction in the patient with sepsis. *Curr Opin Crit Care*, 8: 376-388
- Landry DW, Oliver JA. 2001. The Pathogenesis of vasodilatory shock. *N Engl J Med*. Aug; 345(8): 588-595
- Levy MM, Fink MP, Marshall JC, Abraham E, Angus D, Cook D, Cohen J, Opal SM, Vincent JL, Ramsay G. 2003. 2001 SCCM/ESICM/ACCP/ATS/SIS International sepsis definition conference. *Intensive Care Med*, 29: 530-538
- Lightle S, Tosheva R, Lee A, Queen-Baker J, Boyanovsky B, Shedlofsky S, Nikolova-Karakashian M. 2003. Elevation of ceramide in serum lipoproteins during acute phase response in humans and mice: role of serine-palmitoyl transferase. *Arch Biochem Biophys*, 419: 120–128
- Loidl, A., Sevcsik, E., Riesenhuber, G., Deigner, H. P., and Hermetter, A. 2003. Oxidized phospholipids in minimally modified low density lipoprotein induce apoptotic signaling via activation of acid sphingomyelinase in arterial smooth muscle cells. *J Biol Chem*, 278: 32921–32928
- Loidl, A., Claus, R., Ingolic, E., Deigner, H. P., and Hermetter, A. 2004. Role of ceramide in activation of stress-associated MAP kinases by minimally modified LDL in vascular smooth muscle cells. *Biochim Biophys Acta*, 1690: 150–158

- Mann DL, Bristow MR. 2005. Mechanisms and models in heart failure: The biomechanical model and beyond. *Circulation*, May; 111(21):2837-2849
- Marathe S, Schissel SL, Yellin MJ, Beatini N, Mintzer R, Williams KJ, Tabas I. 1998. Human vascular endothelial cells are a rich and regulatable source of secretory sphingomyelinase. Implications for early atherogenesis and ceramide-mediated cell signaling. *J Biol Chem*. Feb; 273 (7): 4081-4088
- Marathe S, Kuriakose G, Williams KJ, Tabas I. 1999. Sphingomyelinase, an enzyme implicated in atherogenesis, is present in atherosclerotic lesions and binds to specific components of the subendothelial extracellular matrix. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 19: 2648-2658
- Marchesini N, Hannun YA. 2004. Acid and neutral sphingomyelinases: roles and mechanisms of regulation. *Biochem Cell Biol*, 82: 27-44
- Marshall JC, Cook DJ, Christou NV, Bernard GR, Sprung CL, Sibbald WJ. 1995. Multiple Organ Dysfunction Score: A reliable descriptor of a complex clinical outcome. *Crit Care Med*, Oct; 23(10): 1638-1652
- Marshall JC. 2001. Inflammation, coagulopathy, and the pathogenesis of multiple organ dysfunction syndrome. *Crit Care Med*, 29 (7 Suppl): S99-S106
- Marshall JC, Vincent JL, Fink MP, Cook DJ, Rubenfeld G, Foster D, Fisher Jr CJ, Faist E, Reinhart K. 2003. Measures, markers and mediators: Toward a staging system for clinical sepsis. A report of the Fifth Toronto Sepsis Roundtable, Toronto, Ontario, Canada, October 25-26, 2000. *Crit Care Med*, 31 (5): 1560-1567
- Mathias S, Penna LA, Kolesnick RN. 1998. Review article: Signal transduction of stress via ceramide. *Biochem J*, 335: 465-480
- Matot I, Sprung CL. 2001. Definition of sepsis. *Intensive Care Med*, 27: S3-S9
- Moerer O, Burchardi H. 2004. Außerordentliche ökonomische Belastung – Epidemiologie und Kosten der Sepsis. *Klinikerzt*, 33(6):177-180
- Nakashima I, Kato M, Akhand AA, Suzuki H, Takeda K, Hossain K, Kawamoto Y. 2002. Redox-linked signal transduction pathways for protein tyrosine kinase activation. *Antioxid Redox Signal*, 4: 517–531
- Nathan C. 2002. Points of control in inflammation. *Nature*, Dec, 420: 846-852.
- Ni X, Morales CR. 2006. The lysosomal trafficking of acid sphingomyelinase is mediated by sortilin and mannose 6-phosphate receptor. *Traffic*, 7: 889-902
- Nilsson Å, Duan R-D. 2006. Absorption and lipoprotein transport of sphingomyelin. *J Lipid Res*, 47(1): 154-171
- Oral H, Dorn GW, Mann DL. 1997. Sphingosine mediates the immediate negative inotropic effects of TNF in the adult mammalian cardiomyocytes. *J Biol Chem*, 272: 4836-4842

- Papathanassoglou EDE, Moynihan JA, Ackerman MH. 2000. Does programmed cell death (apoptosis) play a role in the development of multiple organ dysfunction in critically ill patients? A review and a theoretical framework. *Crit Care Med*, 28(2): 537-549
- Parissis JT, Adamopoulos S, Karas SM, Kremastinos DT. 2002. An overview of inflammatory cytokine cascade in chronic heart failure. *Hellenic J Cardiol*, 43:18-28
- Pfeiffer A, Böttcher A, Orso E, Kapinsky M, Nagy P, Bodna A, Spreitzer I, Liebisch G, Drobnik W, Gempel K, Horn M, Holmer S, Hartung T, Multhoff G, Schütz G, Schindler H, Ulmer AJ, Heine H, Stelter F, Schütt C, Rothe G, Szöllosi, Damjanovich S, Schmitz G. 2001. Lipopolysaccharide and ceramide docking to CD14 provokes ligand-specific receptor clustering in rafts. *Eur J Immunol*, 31: 3153–3164
- Pettus BJ, Chalfant CE, Hannun YA. 2002. Ceramide in apoptosis: an overview and current perspectives. *Biochim Biophys Acta*, 1585: 114–125
- Pettus BJ, Chalfant CE, Hannun YA. 2004. Sphingolipids in inflammation: roles and implications. *Curr. Mol Med*, 4:408-418
- Prieschl EE, Baumruker T. 2000. Sphingolipids: second messengers, mediators and raft constituents in signaling. *Immunol Today*, 21:555–560
- Pschyrembel W. Pschyrembel Klinisches Wörterbuch. 260. Auflage. Herausgegeben von Autorenkollektiv. deGruyter, Berlin - New York, 2004.
- Qiu H, Edmunds T, Baker-Malcolm J, Karey KP, Estes S, Schwarz C, Hughes H, Van Patten SM. 2003. Activation of human acid sphingomyelinase through modification or deletion of C-terminal cysteine. *J Biol Chem*, 278: 32744–32752
- Rauchhaus M, Doehner W, Francis DP, Davos C, Kemp M, Liebenthal C, Niebauer J, Hooper J, Volk H-D, Coats AJS, Anker SD. 2000. Plasma cytokine parameters and mortality in patients with chronic heart failure. *Circulation*, 102: 3060-3067.
- Rauchhaus M, Müller-Werdan U. 2001. Zytokine bei Herzkrankheiten. *Internist*, 42:75-84
- Reinhart K, Brunkhorst FM. 2002. Die Sepsis. *Zentralbl Chir*, 127(3): 161-163
- Rosenberg AL. 2002. Recent innovations in intensive care unit risk-prediction models. *Curr Opin Crit Care*, 8: 321–330
- Ruokonen E, Parviainen I, Uusaro A. 2002. Treatment of impaired perfusion in septic shock. *Ann Med*, 34: 590-597
- Ryu S-K, Ahn DS, Cho Y-E, Choi S-K, Kim Y-H, Morgan KG, Lee Y-H. 2006. Augmented sphingosylphosphorylcholine-induced  $Ca^{2+}$  -sensitization of mesenteric artery contraction in spontaneously hypertensive rat. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol*, 373: 30-36
- Sathishkumar S, Boyanovsky B, Karakashian AA, Rozenova K, Giltaiy NV, Kudrimoti M, Mohiuddin M, Ahmed MM, Nikolova-Karakashian M. 2005. Elevated sphingomyelinase activity and ceramide concentration in serum of patients undergoing high dose spatially fractionated radiation treatment. Implications for endothelial apoptosis. *Cancer Biology & Therapy*. Sept; 4(9): 979-986

- Schissel SL, Tweedie-Hardman J, Rapp JH, Graham G, Williams KJ, Tabas I. 1996a. Rabbit aorta and human atherosclerotic lesions hydrolyze the sphingomyelin of retained low-density lipoprotein. Proposed role for arterial-wall sphingomyelinase in subendothelial retention and aggregation of atherogenic lipoproteins. *J Clin Invest*, 98(6): 1455-1464
- Schissel SL, Schuchman EH, Williams KJ, Tabas I. 1996b.  $Zn^{2+}$ -stimulated Sphingomyelinase is secreted by many cell types and is a product of the acid sphingomyelinase gene. *J Biol Chem*. Aug; 271 (31): 18431-18436
- Schissel SL, Keesler GA, Schuchman EH, Williams KJ, Tabas I. 1998a. The cellular trafficking and zinc dependence of secretory and lysosomal sphingomyelinase, two products of the acid sphingomyelinase gene. *J Biol Chem*. July; 273 (29): 18250-18259
- Schissel SL, Jiang X-c, Tweedie-Hardman J, Jeong T-s, Hurt Camejo E, Najib J, Rappi JH, Williams KJ, Tabas I. 1998b. Secretory sphingomyelinase, a product of the acid sphingomyelinase gene, can hydrolyze atherogenic lipoproteins at neutral pH. Implications for atherosclerotic lesion development. *J Biol Chem*, 273 (5): 2738-2746
- Scheel-Toellner D, Wang K, Craddock R, Webb PR, McGettrick HM, Assi LK, Parkes N, Clough LE, Gulbins E, Salmon M, Lord JM. 2004. Reactive oxygen species limit neutrophil life span by activating death receptor signaling. *Blood*, 104: 2557-2564
- Strackowski M, Kowalska I, Nikolajuk A, Dzienis-Strackowska, Kinalska I, Baranowski M, Zendzian-Piotrowska M, Brzezinska Z, Gorski J. 2004. Relationship between insulin sensitivity and sphingomyelin signaling pathway in human skeletal muscle. *Diabetes*, 53: 1215-1221
- Strle K, Broussard SR, McCusker RH, Shen WH, Johnson RW, Freund GG, Dantzer R, Kelley KW. 2004. Proinflammatory cytokine impairment of insulin-like growth factor I-induced protein synthesis in skeletal muscle myoblasts requires ceramide. *Endocrinology*, 145(10): 4592-4602
- Subramanian VA, Patel NU. 2001. Current status of MIDCAB procedure. *Curr Opin Cardiol*, 16: 268-270
- Tabas I. 1999. Secretory sphingomyelinase. *Chem Phys Lipids*, 102: 123-130
- Takahashi T, Abe T, Sato T, Miura K, Takahashi I, Yano M, Watanabe A, Imashuku S, Takada G. 2002. Elevated sphingomyelinase and hypercytokinemia in hemophagocytic lymphohistiocytosis. *J Pediatr Hematol Oncol*, 24: 401-404
- Tomic V, Russwurm S, Möller E, Claus RA, Blaess M, Brunkhorst FM, Bruegel M, Bode K, Bloos F, Wippermann J, Wahlers T, Deigner H-P, Thiery J, Reinhart K, Bauer M. 2005. Transcriptomic and Proteomic Patterns of Systemic Inflammation in On-Pump and Off-Pump Coronary Artery Bypass Grafting. *Circulation*, 112: 2912-2920
- Vallely MP, Bannon PG, Kritharides L. 2001. The systemic inflammatory response syndrome and Off-pump cardiac surgery. *The Heart Surgery Forum Supplement*, #2000-52399 4(Supp1): S7-S13

- Vincent JL, Moreno R, Takala J, Willats S, De Mendonca A, Bruining H, Reinhart CK, Suter PM, Thijs LG. 1996. The SOFA (sepsis-related organ failure assessment) score to describe organ dysfunction/ failure. On behalf of the working group on sepsis-related problems of the european society of intensive care medicine. *Intensive Care Med*, 22(7): 707-710
- Vincent JL, Bernard GR, Beale R, Doig C, Putensen C, Dhainaut JF, Artigas A, Fumagalli R, Macias W, Wright T, Wong K, Sundin DP, Turlo MA, Janes J. 2005 . Drotrecogin alfa (activated) treatment in severe sepsis from the global open-label trial ENHANCE: further evidence for survival and safety and implications for early treatment. *Crit Care Med*. Oct;33(10): 2266-77
- Volterrani M, Clark AL, Ludman PF, Swan JW, Adamopoulos S, Piepoli M, Coats AJ. 1994. Predictors of exercise capacity in chronic heart failure. *Eur Heart J*, 15: 801-809.
- Wan S, LeClerc J-L, Vincent J-L. 1997. Inflammatory response to cardiopulmonary bypass. Mechanisms involved and possible therapeutic strategies. *Chest*, 112: 676-692
- Weigand MA, Bardenheuer HJ, Böttiger BW. 2003. Klinisches Management bei Patienten mit Sepsis. *Anaesthesist*, 52:3-22
- Weigand MA, Hörner C, Bardenheuer HJ, Bouchon A. 2004. The systemic inflammatory response syndrome. *Best Practice & Research Clinical Anaesthesiology*, 18 (3): 455-475.
- Wong ML, Xie B, Beatini N, Phu P, Marathe S, Johns A, Gold PW, Hirsch E, Williams KJ, Licinio J, Tabas I. 2000. Acute systemic inflammation up-regulates secretory sphingomyelinase in vivo: a possible link between inflammatory cytokines and atherogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 97:8681-8686.
- Zachowski A. 1993. Phospholipids in animal eukaryotic membranes: transverse asymmetry and movement. *Biochem J*, 294: 1-14
- Zhang DX, Yi FX, Zou AP, Li PL. 2002. Role of ceramide in TNF-alpha-induced impairment of endothelium-dependent vasorelaxation in coronary arteries. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 283: 1785-94.
- Zimmerman GA, McIntyre TM, Prescott SM, Stafforini DM. 2002. The platelet-activating factor signaling system and its regulators in syndromes of inflammation and thrombosis. *Crit Care Med*, 30(Suppl.): S294 –S301

Tab. 1: Definition von SIRS, Sepsis, schwerer Sepsis und septischer Schock (Levi et al. 2003) modifiziert nach einem Konsensus Vorschlag der Arbeitsgruppe Sepsis der European Society of Intensive Care Medicine (Landry et al. 2001) und den Empfehlungen der Deutschen Sepsis Gesellschaft (www.sepsis-gesellschaft.de).

**SIRS:** mindestens 2 Kriterien II

**Sepsis:** Kriterien I und mindestens 2 Kriterien II,

**Schwere Sepsis:** Kriterien I, mindestens 2 Kriterien II und mindestens 1 Kriterium III

**Septischer Schock:** Kriterien I und mindestens 2 Kriterien II sowie für wenigstens eine Stunde ein systolischer arterieller Blutdruck  $\leq 90$  mmHg bzw. ein mittlerer arterieller Blutdruck  $\leq 65$  mmHg oder ein notwendiger Vasopressoreinsatz \*, um den systolischen arteriellen Blutdruck  $\geq 90$  mmHg oder den arteriellen Mitteldruck  $\geq 75$  mmHg zu halten. Die Hypotonie besteht trotz adäquater Volumengabe und ist nicht durch eine andere Schockform zu erklären.

(\* Dopamin  $\geq 5 \mu\text{g kg}^{-1} \text{min}^{-1}$  bzw. Noradrenalin, Adrenalin, Phenylepinephrin oder Vasopressin unabhängig von der verabreichten Dosierung)

### **I. Infektiologische Genese der Infektion**

Diagnose einer Infektion über den mikrobiologischen Nachweis oder durch klinische Kriterien

### **II. Systemisches Inflammationssyndrom (SIRS)**

- 1. Fieber** ( $\geq 38^\circ\text{C}$ ) oder Hypothermie ( $\leq 36^\circ\text{C}$ ) bestätigt durch eine rektale, intravasale oder vesikale Messung
- 2. Tachykardie:**  
Herzfrequenz  $\geq 90$  /min
- 3. Tachypnoe** (Frequenz  $\geq 20$ /min) oder Hyperventilation ( $\text{PaCO}_2 \leq 4.3 \text{ kPa} / \leq 33 \text{ mmHg}$ )
- 4. Leukozytose** ( $\geq 12000/\text{mm}^3$ ) oder **Leukopenie** ( $\leq 4000/\text{mm}^3$ ) oder  $\geq 10\%$  unreife Neutrophile im Differentialblutbild

### **III. Akute Organdysfunktion**

- 1. Metabolische Azidose** (Base Excess  $\leq -5 \text{ mmol/l}$  oder eine Plasma-Laktat-Konzentration  $> 1,5$  fach oberhalb des Referenzbereichs des jeweiligen Labors)
- 2. Renale Dysfunktion** (Urinausscheidung  $\leq 0,5 \text{ ml/kg/h}$  über zumindestens zwei Stunden trotz ausreichender Volumensubstitution und/oder Anstieg des Serum-Kreatinins  $> 2$  fach oberhalb des Referenzbereichs des jeweiligen Labors.)
- 3. Arterielle Hypoxämie** ( $\text{PaO}_2 \leq 10 \text{ kPa} (\leq 75 \text{ mmHg})$  unter Raumluft,  $\text{PaO}_2/\text{FiO}_2$ -Verhältnis von  $\leq 33 \text{ kPa} (\leq 250 \text{ mmHg})$  unter Sauerstoffapplikation - eine manifeste pulmonale oder kardiale Erkrankung muss als Ursache der Hypoxämie ausgeschlossen sein.)
- 4. Arterielle Hypotension** (systolischer Blutdruck  $\leq 90 \text{ mmHg}$  oder mittlerer arterieller Blutdruck  $\leq 70 \text{ mmHg}$  über mind. 1 Stunde trotz adäquater Volumenzufuhr bei Abwesenheit anderer Schockursachen)
- 5. relative oder absolute Thrombozytopenie** (Thrombozyten  $\leq 100.000/\mu\text{l}$  oder Thrombozytenabfall  $> 30\%$  innerhalb von 24 Stunden. Eine Thrombozytopenie durch akuten Blutverlust oder immunologische Ursache muss ausgeschlossen sein.)
- 6. Akute Enzephalopathie**  
(eingeschränkte Vigilanz, Desorientiertheit, Unruhe, Delirium)

Tab. 3: Individuelle Charakterisierung der Patienten mit septischem Schock und schwerer Sepsis (Verstorbene n=7; Fallnummer 1-7 und Überlebende n=5; Fallnummer 8-12)

Fall Nr.	Alter	Genus	Grundkrankheit	Sepsisherd	Mikrobiologie	ITS Liegedauer [Tage]	Schwere Sepsis/ Septischer Schock [Tage]	APACHE II [Punkte]	Outcome
1	28	M	Intrakranielle Blutung, Leberabszess	Pneumonie, intraabdominal	Pseudomonas, Enterococcus, Candida ssp.	38	28	25	Multiorganversagen
2	51	F	Peritonitis, Dünndarmperforation	Intraabdominal	E. coli	6	6	6	Multiorganversagen
3	65	M	Blasenkarzinom	Pneumonie	Pseudomonas, Klebsiella,	12	12	34	Multiorganversagen
4	72	F	Hüftarthrose, Hüft TEP	Pneumonie, Wundinfektion	Staph. aureus	28	27	21	Multiorganversagen
5	68	M	Arterielle Verschlusskrankheit, aortoiliakale Rekonstruktion	Pneumonie	Nicht identifiziert	11	8	25	Septischer Schock
6	78	M	Aortenklappeninsuffizienz, thorakales Aortenaneurysma	Pneumonie	Nicht identifiziert	5	5	24	Septischer Schock
7	79	M	Arterielle Verschlusskrankheit, aortoiliakale Rekonstruktion	Pneumonie	Staph. aureus, Candida ssp.	17	10	29	HerzKreislaufversagen
8	47	M	Sepsis nach transrektaler Prostatomie	Urogenital	E. coli	6	3	22	verlegt
9	63	F	Nephritischer Abszess	Urogenital	Klebsiella Pneumoniae	12	12	35	verlegt
10	59	F	Peritonitis, Ovarialabszess	Intraabdominal	Enterococcus	19	5	13	verlegt
11	23	M	Polytrauma	Pneumonie	Enterobacter	27	18	15	verlegt
12	47	F	Kolonkarzinom, Hemikolektomie Peritonitis	Pneumonie	Candida ssp.	54	38	22	verlegt



Ergebnisse der Arbeit wurden zu Teilen veröffentlicht und präsentiert:

## Publikationen

Claus RA, Bunck AC, Bockmeyer CL, Brunkhorst FM, Losche W, Kinscherf R, Deigner HP (2005) Role of increased sphingomyelinase activity in apoptosis and organ failure of patients with severe sepsis. *FASEB J.* **19**:1719-21.

Doehner W\*, Bunck AC\*, Rauchhaus M, von Haehling S, Cicoria M, Ponikowski P, Brunkhorst FM, Claus RA, Anker SD. Secretory Sphingomyelinase is upregulated in chronic heart failure: a second messenger of immune activation relates to body composition, muscular functional capacity and peripheral blood flow. *Eur Heart J.* 2007 Apr; 28(7):821-8. Epub 2007 Mar 12. (\*gleichberechtigte Erstautorenschaft).

## Zitierfähige Abstracts

Claus RA, Bunck AC, Kinscherf R and Deigner HP, Sphingomyelinase activity in sepsis, Gordon Research Conference Glycolipid and Sphingolipid Biology 2006, Jan. 8-13, Ventura, California, USA.

Doehner W, Claus RA, von Haehling S, Bunck A, Cicoria M, Rauchhaus M, Ponkowski PP, Brunkhorst FM, Anker SD (2005) Increased activity of secreted sphingomyelinase in chronic heart failure - Marker of immune and metabolic imbalance. *J Am Coll Cardiology* 45 (Suppl A), 177A.

Bunck AC, Bockmeyer CL, Brunkhorst FM, Reinhart K, Deigner HP, Claus RA: Increased activity of secreted sphingomyelinase in SIRS and Sepsis. 2<sup>nd</sup> International Congress on Sepsis and Multi Organ Dysfunction 2005, Weimar, Weimar, 7.-10.9.2005, *Infection* 33, (Suppl 1): 17, 2005

Claus RA, Bunck AC, Deigner HP, Hermetter A, Reinhart K, Brunkhorst FM (2003) Increased activity of secreted sphingomyelinase in sepsis and septic shock. 1<sup>st</sup> International Congress on Sepsis and Multi Organ Dysfunction 2003, Weimar, Weimar, 9.-12.9.2003, *Infection* 31 (Suppl 1): 271, 2003.

Bunck AC, Bockmeyer CL, Brunkhorst FM, Reinhart K, Deigner HP, Claus RA: Increased Activity of Secreted Sphingomyelinase in SIRS and Sepsis. 7th German Interdisciplinary Congress for Intensive Care Medicine, Hamburg, Dec, 1-4, 2004 German Interdisciplinary J. Int. Care Med. 41 (Suppl 1) 113.

## Vortrag im Rahmen der Veranstaltung “Tag der Nachwuchswissenschaftler des FZL” der FSU Jena

Erster Preis für den Vortrag zum Thema: “Activity of Secreted Sphingomyelinase in Plasma of Critically Ill Patients with Systemic Inflammatory Response Syndrome (SIRS) and Sepsis.”

## **Danksagung**

In erster Linie danke ich Dr. rer. nat. RA Claus, der auch die initiale Idee für dieses Projekt hatte, für die exzellente Betreuung und Unterstützung bei der Anfertigung meiner Promotion. Für die Beratung in klinischen Fragestellungen danke ich Herrn Dr. med. FM Brunkhorst und Herrn Prof. M Bauer.

Für die Bereitstellung des Probenmaterials und der klinischen Daten der herzchirurgischen Patienten danke ich Herrn Prof. T. Wahlers und den in die Studie eingebundenen Mitarbeitern der Klinik für Herz-/Thoraxchirurgie.

Ein entsprechender Dank geht auch an Herrn Dr. med. W. Döhner und Herrn Prof. SD Anker für die Bereitstellung des Probenmaterials und der klinischen Daten der herzinsuffizienten Patienten.

Des weiteren danke ich dem gesamten Personal der Intensivstation der Klinik für Anästhesiologie und Intensivtherapie, Jena, wobei insbesondere die Studienschwestern Frau Ulrike Pfeil und Frau Petra Bloos hervorzuheben sind, welche für die Bereitstellung der Plasmaproben und der entsprechenden klinischen Patientendaten von entscheidender Notwendigkeit waren.

Für hilfreiche Tipps bei Datenerhebung, Datenanalyse, Auswertung und Manuskriptgestaltung danke ich Herrn PD Dr. med. W. Lösche, Herrn Dr. rer. nat. V. Oberle und Herrn Dr. med. W. Döhner.

Bei Frau Edith Walther, Frau Brigitte Specht möchte ich mich für die hilfsbereite Unterstützung während meiner gesamten experimentellen Tätigkeit im Labor und für die Lösung labortechnischer Fragestellungen bedanken.

### **Ehrenwörtliche Erklärung**

Hiermit erkläre ich, dass mir die Promotionsordnung der Medizinischen Fakultät der Friedrich-Schiller-Universität bekannt ist,

ich die Dissertation selbst angefertigt habe und alle von mir benutzten Hilfsmittel, persönlichen Mitteilungen und Quellen in meiner Arbeit angegeben sind,

mich folgende Personen bei der Auswahl und Auswertung des Materials sowie bei der Herstellung des Manuskripts unterstützt haben: Dr. rer. nat. RA Claus, Prof. Dr. med. M Bauer, PD Dr. med. W Lösche, Dr. med. W Döhner, Dr. med. FM Brunkhorst,

die Hilfe eines Promotionsberaters nicht in Anspruch genommen wurde und dass Dritte weder unmittelbar noch mittelbar geldwerte Leistungen von mir für Arbeiten erhalten haben, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen,

dass ich die Dissertation noch nicht als Prüfungsarbeit für eine staatliche oder andere wissenschaftliche Prüfung eingereicht habe und

dass ich die gleiche, eine in wesentlichen Teilen ähnliche oder eine andere Abhandlung nicht bei einer anderen Hochschule als Dissertation eingereicht habe.

A. Bunck

Münster, 19.07.2007